



分类号: R78

学号: 2021120622

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

(专业学位)

PNI 相关口腔鳞癌微环境中施万细胞促进肿瘤进

论文题目

展的作用机制

作者姓名

蔡永鹏

指导教师姓名(职称、单位名称)

李勇 教授

重庆医科大学附属口腔医院

一级学科名称

口腔医学

二级学科名称

口腔颌面外科学

论文答辩年月

2024 年 5 月

目 录

前言.....	9
第一部分 PNI 在 OSCC 患者中呈现出高发生率,具有部位差异性	11
1 材料与方法.....	11
1.1 材料与仪器.....	11
1.2 实验方法.....	12
2 实验结果.....	17
2.1 OSCC 显示出高 PNI 发生率,呈现出部位差异性	17
2.2 PNI 相关 OSCC 肿瘤中心 S100B 表达高于癌旁正常组织	19
2.3 PNI 肿瘤标本中肿瘤中心的炎症水平高于癌旁组织.....	19
3 讨论.....	20
第二部分 SCs 促进肿瘤增殖、迁移、侵袭和 EMT	22
1 材料与方法.....	22
1.1 材料与仪器.....	22
1.2 实验方法.....	23
2 实验结果.....	28
2.1 共培养 SCs 促进 OSCC 细胞增殖.....	29
2.2 SCs 在二维平面促进 OSCC 细胞的迁移.....	29
2.3 SCs 在三维平面促进 OSCC 细胞的迁移和增殖.....	30
2.4 SCs 在体外促进 OSCC 的 EMT 过程	31
2.5 受 SCs 激活的 OSCC 在体内获得了更强的增殖能力	32
3 讨论.....	33
第三部分 SCs 通过 CCL3/CCL4-CCR5 途径促进 OSCC 细胞迁移、 侵袭和 EMT 并上调炎症水平	35
1 材料与方法.....	35
1.1 材料与仪器.....	35
1.2 实验方法.....	35
2 实验结果.....	37
2.1 SCs 在体外改变 OSCC 炎症水平,同时启动 NF- κ B 相关通路	37
2.2 共培养促进 SCs 与 OSCC 之间的 CCL3/CCL4-CCR5 信号 交互	38
2.3 阻断 OSCC 的 CCR5 受体能部分逆转 SCs 的促肿瘤增殖 作用	41
2.4 阻断 OSCC 的 CCR5 受体能部分逆转 SCs 的促肿瘤迁移	

和侵袭能力	42
2.5 SCs 促肿瘤的 EMT 过程可被 CCR5i 部分逆转	43
2.6 CCR5i 抑制 SCs 的促炎作用	44
3 讨论	44
全文总结	46
参考文献	48
综述 施万细胞促进头颈癌增殖、侵袭机制的研究进展	51
1 外周 SCs 与癌症-神经串扰	52
1.1 PNS 与 SCs 的联系	52
1.2 癌症-神经串扰	53
2 SCs 在头颈癌 TME 中的作用	54
2.1 SCs 重编程促进头颈癌进展	54
2.2 SCs 通过产生多种 ECM 成份促进头颈癌进展	55
2.3 SCs 通过多种信号分子重塑 TME 并促进头颈癌进展	55
3 头颈癌潜在的治疗干预措施	58
4 结语	60
参考文献	61

缩写说明

英文缩写	英文全称	中文全称
CCL4	Small inducible cytokine A4	趋化因子配体 4
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	趋化因子受体 5 型
CCR5i	Chemokine receptor type 5 inhibitors	趋化因子受体 5 型抑制 剂
°C	Celsius	摄氏度
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate hydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HE	Hematoxylin and Eosin	苏木精-伊红染色
H	Hour	小时
IL	Interleukin	白细胞介素
IF	Immunofluorescence	免疫荧光
IHC	Immunohistochemical	免疫组织化学
IL-1 β	Interleukin 1 β	白介素 1 β
Min	Minute	分钟
ml	Milliliter	毫升
NT	Neurotrophin	神经营养因子

NGF	Nerve growth factor	神经生长因子
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma	口腔鳞状细胞癌
OD	optical density	吸光度
PNS	Peripheral Nervous System	外周神经系统
PNI	Perineural infiltration	神经周围浸润
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲盐水
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	RIPA 裂解缓冲液
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
SCs	Schwann cells	施万细胞
TME	Tumor microenvironment	肿瘤微环境
TNF- α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
TBST	Tris Buffer Saline + Tween	TBST 缓冲液
μ l	Microlitre	微升
WB	Western blot	蛋白质印迹

PNI 相关口腔鳞癌微环境中施万细胞促进肿瘤进展的作用机制

摘要

目的：鳞状细胞癌（OSCC）是最常见的口腔恶性肿瘤，其中伴有神经周围浸润（PNI）的 OSCC 患者常表现出低生存率和高局部区域复发率等不良预后。近年来，研究发现 PNI 的发生机制可能涉及肿瘤细胞和外周神经成分（尤其是 SCs）之间的信号串扰模式。作为外周神经系统（PNS）中的重要成分，施万细胞（SCs）一方面参与构成有髓神经纤维的神经内膜以及无髓神经纤维的 Remak 结构；另一方面，SCs 能释放多种信号分子（炎症因子、神经营养因子和趋化因子等）重编程自身和周围环境。口腔颌面部具有丰富的周围神经，而其中的 SCs 理应参与 PNI 相关的 OSCC 肿瘤微环境（TME）中的信号串扰过程。本研究将对 PNI 在口腔鳞癌中的发生率和部位分布情况进行分析；并对 TME 中 SCs 与肿瘤细胞之间的信号交互过程在 OSCC 进展中的作用进行初步研究，从而为 PNI 相关 OSCC 的靶向治疗提供一定的实验基础和理论依据。

方法：（1）通过免疫组化、免疫荧光染色和病理结果确定本院 30 例 OSCC 患者的 PNI 情况，使用卡方检验分析其 PNI 发生率和 PNI 部位分布情况。（2）通过 Transwell 系统在体外构建 RSC96 与 HSC-3 细

胞的共培养模型用于收集共培养 SCs 条件培养基 (co-RCM)、SCs 上清液、共培养条件下两种细胞分别的 mRNA 和总蛋白。根据使用不同的条件培养基 (DMEM、RCM、co-RCM) 处理, 将 HSC-3 分为三组, 通过 CCK-8 增殖实验、划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验评估 HSC-3 的增殖、迁移和侵袭能力。使用蛋白质印迹 (WB) 和 qRT-PCR 分析不同组别肿瘤细胞中 EMT 相关蛋白表达水平的差异。(3) 通过 PCR 分析不同组中 RSC-96 和 HSC-3 差异表达的多种信号基因, ELISA 实验验证 RSC-96 上清液中蛋白分泌的差异。通过相应抑制剂阻断配体受体结合验证其对肿瘤的促进作用, 进而探索 SCs 促 OSCC 进展的作用机制。(4) 通过构建裸鼠皮下成瘤模型测量不同条件培养基预处理后 HSC-3 的成瘤体积, 以评估 SCs 在体内对 OSCC 的促进作用。

结果: (1) 在 53.3% 的 OSCC 患者中发现了 PNI, 不同部位的肿瘤, 其 PNI 发生率具有显著差异性, 其中舌鳞癌的 PNI 发生率最高, 达 87.5%。(2) RSC-96 在体外促进 HSC-3 的增殖、迁移、侵袭和 EMT。

(3) 受 HSC-3 激活的 RSC-96 表达更高水平的趋化因子 CCL3/CCL4; 与 RSC-96 共培养后的 HSC-3 表达更高水平的 CCR5 基因。使用马拉维洛克阻断 CCR5 受体后能部分逆转 RSC-96 的促肿瘤作用和 EMT 过程。(4) co-RCM 组的 HSC-3 在裸鼠体内的成瘤效果显著优于 RCM 组和 DMEM 组。

结论: PNI 在 OSCC 中存在着高发生率和部位差异性, 并能促进 OSCC 的多种恶性生物学表征, 其内在机制可能是 SCs 与 OSCC 细胞

相互作用并释放趋化因子 CCL3 和 CCL4，然后通过肿瘤细胞的 CCR5 受体加速肿瘤进展。

关键词： 口腔鳞状细胞癌，施万细胞，神经周围浸润，CCR5

**THE MECHANISM OF SCHWANN CELLS PROMOTING
TUMOR PROGRESSION IN THE PNI-ASSOCIATED
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
MICROENVIRONMENT**

ABSTRACT

Objective: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common form of oral malignant diseases, and patients with perineural infiltration (PNI) often experience poor survival rates and local recurrence. In recent years, PNI has been thought to involve patterns of signal crosstalk between tumor cells and components of peripheral nerves, particularly Schwann cells (SCs). As an essential component of the peripheral nervous system (PNS), SCs are involved in the formation of the endoneurium with myelinated nerve fibers and the Remak structure of unmyelinated nerve fibers. On the other hand, SCs can release various signaling molecules (inflammatory factors, neurotrophic factors, chemokines, etc.) to reprogram themselves and their surroundings. The oral and maxillofacial region contains abundant peripheral nerves, and the SCs within these nerves are likely involved in the

signal crosstalk process of the PNI-related OSCC tumor microenvironment (TME). This study aimed to investigate the incidence and location distribution of PNI in oral squamous cell carcinoma and explore the role of signal interaction between SCs and tumor cells in the progression of OSCC in the TME. The study aimed to provide an experimental and theoretical basis for targeted therapy of PNI-related OSCC.

Methods: (1) PNI was determined by immunohistochemistry, immunofluorescence staining, and pathological results of 30 OSCC patients in our hospital. The incidence of PNI and the location distribution of PNI were analyzed using the Chi-square test. (2) An in vitro co-culture model of RSC96 and HSC-3 cells was constructed using a Transwell system. mRNA and total protein were collected from the two cell types under co-culture condition medium (co-RCM), Schwann cell supernatant, and co-culture conditions, respectively. Based on different conditioned media (DMEM, RCM, co-RCM), HSC-3 cells were divided into three groups, and their proliferation, migration, and invasion abilities were evaluated by CCK-8 proliferation assay, scratch assay, and Transwell migration and invasion assays. Western blot (WB) and qRT-PCR were used to analyze differences in the expression levels of EMT-related proteins in the different groups of tumor cells. (3) Multiple signaling genes differentially expressed in RSC-96 and HSC-3 cells in different groups were analyzed by PCR, and differences in protein secretion in the RSC-96 supernatant were verified by ELISA. By

blocking ligand-receptor binding with corresponding inhibitors, the promotion effect of the ligand-receptor on tumors was verified, and the mechanism of Schwann cells promoting OSCC progression was explored. (4) To evaluate the promotion effect of Schwann cells on OSCC in vivo, a subcutaneous tumor formation model in nude mice was constructed. Tumor volumes of HSC-3 cells pretreated with different media conditions were measured.

Results: (1) The incidence of PNI in OSCC patients was 53.3%, and the incidence of PNI in tongue squamous cell carcinoma was remarkably high at 87.5%. (2) RSC-96 Schwann cells promoted proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HSC-3 oral cancer cells in vitro. (3) RSC-96 Schwann cells activated by HSC-3 cells expressed higher levels of the chemokines CCL3/CCL4, while HSC-3 cells co-cultured with RSC-96 expressed higher levels of the CCR5 gene. Blocking the CCR5 receptor with Maraviroc partially reversed the tumor-promoting effect and EMT process induced by RSC-96. (4) In the nude mice model, the tumor formation ability of HSC-3 cells was significantly enhanced in the co-RCM group compared to the RCM group and DMEM group.

Conclusion: PNI exhibits a high incidence and distinct site distribution in OSCC cases, and it can promote various malignant biological characteristics of OSCC. The underlying mechanism may involve an

interaction between Schwann cells and OSCC cells, wherein Schwann cells release the chemokines CCL3 and CCL4, which accelerate tumor progression through the CCR5 receptor on tumor cells.

Key words: oral squamous cell carcinoma, Schwann cells, Perineural infiltration, CCR5

PNI 相关口腔鳞癌微环境中施万细胞促进肿瘤进展的作用机制

前言

头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 已成为世界上第六大常见癌症, 每年出现约 89 万新病例和 45 万死亡病例^[1, 2]。而口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 是最为常见的 HNSCC, 近 20 年来发病率逐渐上升^[3]。2020 年, 全球新增口腔癌病例超过 375000 例, 死亡人数超过 175000 例^[1]。

肿瘤微环境 (TME) 在口腔癌的发生和发展中具有重要作用。肿瘤微环境由肿瘤细胞以及周围组织、细胞、各种信号分子和细胞外基质 (ECM) 构成^[4]。这些各组分可发生相互作用并促进肿瘤细胞的生长、增殖和免疫逃逸等, 最终在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用^[4, 5]。外周神经系统 (PNS) 是 TME 的重要组成部分, 在 TME 中通过神经周围浸润 (PNI) 和肿瘤神经支配参与肿瘤进程^[6, 7]。近几年的研究表明, OSCC 的 PNI 发生率高达 82%^[8-10]。

施万细胞 (SCs) 是 PNS 的主要成分, 几乎分布于全身各个解剖部位, 有着促进受损神经修复和再生的重要作用^[11]。SCs 在神经修复环境中可表现出免疫功能, 包括识别抗原、呈递抗原和传递免疫反应^[12]。周围神经鞘从内到外由三层结缔组织组成, 即神经内膜、神经束膜和神经外膜, SCs 作为 PNS 的主要支持细胞, 参与构成 90% 的神经内膜空间^[13]。此外, 对于无髓鞘的感觉神经而言, 往往是许多轴突同时被 SCs 细胞膜包裹着, 但不形成髓鞘, 而是形成称为 Remak 束的结构^[14]。

SCs 除了上述作用外, 还在癌症-神经串扰中扮演着重要角色。近年来, SCs 逐渐被确定为促进肿瘤进展的细胞, 在胰腺癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、头颈癌等多种实体瘤中能促进肿瘤增殖、侵袭并引起或加重癌症疼痛, 尤其在胰腺癌进展中的作用与机制受到广泛的研究^[15-19]。此外, Emory Gregory 等人认为当癌细胞沿着神经束膜侵入并迁移到神经内膜就会发生 PNI^[20]。因此, SCs、癌症和 PNI 在肿瘤微环境中理所当然地被联系了起来。而口腔颌面部丰富的 PNS 使得研究视野逐渐聚焦于 OSCC 微环境中的 SCs 及其释放的各种信号分子。

在神经相关研究中发现 SCs 通过自我重编程能分泌多种信号分子, 包括神经营养因子 (NT) 类蛋白、白介素类炎症因子、趋化因子等。而在癌症中 SCs 能以类似的重编程程序释放相关信号来促进癌症-神经信号串扰和癌症进展^[21]。在 OSCC 的相关研究中, NT 类蛋白在癌症进展中扮演了重要角色。已经明确 SCs 可以通过释放 NGF、BDNF、GDNF 等信号作用于 HNSCC 相关受体并促进癌症迁移和侵袭^[22-24]。但 TME 中的 SCs 所分泌的白介素类炎症因子和趋化因子是否能在口腔鳞癌微环境中起到类似的促肿瘤作用还亟需进一步的研究。

本研究收集了 30 例 OSCC 样本, 通过病理结果和辅助 S100B 免疫荧光及免疫组化染色分析了样本的 PNI 发生率以及部位分布特点。采用了人 OSCC 细胞系 (HSC-3) 和大鼠施万细胞系 (RSC96) 细胞作为研究对象。通过 Transwell 共培养系统获取细胞条件培养基 (CM) 和上清液。通过细胞划痕实验、Transwell 细胞迁移、侵袭实验和 CCK-8 增殖实验研究共培养 CM 对 OSCC 细胞的影响。采用实时荧光定量 PCR 和 ELISA 实验检测了趋化因子 CCL3/CCL4 在 RSC-96 细胞中的基因表达和蛋白分泌水平。与此同时, 通过 qRT-PCR 分析了其他趋化因子和白介素炎症因子基因在不同刺激下 RSC-96 中的表达水平; 分析了相关炎症因子和 CCL3/CCL4 的受体 CCR5 在 HSC-3 细胞中的表达。通过 Westernblot 实验对上皮间充质转化 (EMT) 相关蛋白和 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平进行检测分析。此外, 我们通过 CCR5 受体抑制剂-马拉维洛克阻断 SCs 释放的 CCL3 和 CCL4 信号来研究 SCs 促进 OSCC 进展的相关机制。最后, 我们使用 CM 预处理过的 OSCC 细胞在裸鼠体内皮下成瘤实验中验证了 SCs 处理过的 OSCC 细胞获得了更具侵袭性的行为并携带此特征的表观遗传记忆。本研究为 PNI 相关 OSCC 的免疫治疗提供了一定的实验基础和进一步研究的相关思路。

第一部分 PNI 在 OSCC 患者中呈现出高发生率，具有部位差异性

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

试剂名称	厂商	产地
离心管	mengbio	中国
PBS	Mengbio	中国
多聚甲醛	Solarbio	中国
无水乙醇	川东化工	中国
二甲苯	川东化工	中国
石蜡	Solarbio	中国
柠檬酸钠粉末	Bioss	中国
过氧化氢	德成制药	中国
Rabbit Anti- S100B antibody	华安	中国
Goat Anti-Rabbit IgG secondary antibody	Bioss	中国
山羊血清	Solarbio	中国
DAB	ZSGB-BIO	中国
动物 RNA 提取试剂盒	碧云天	中国
PCR 引物	上海生工	中国
逆转录试剂	Takara	日本
PCR 试剂	ABcolonial	中国
H&E 染色试剂盒	Solarbio	中国
中性树脂	Solarbio	中国
显微镜盖玻片 24*50mm	世泰	中国

DAPI	碧云天	中国
荧光二抗	Abcam	美国

1.1.2 主要仪器

仪器名称	厂商	产地
石蜡包埋机	湖北康强	中国
-80℃冰箱	Haier	中国
切片机	Leica	德国
显微镜	OLYMPUS	日本
烤片机	烤片机	中国
恒温摇床	Thermo Scientific	美国
电磁炉	Midea	中国
Nanodrop 2000	Thermo Scientific	美国

1.2 实验方法

1.2.1 OSCC 标本的收集、分类和染色

本研究涉及的所有方案均经过我院伦理委员会批准（伦理审批编号为：202401161802000554099）。收集我院 2022 年 1 月至 2023 年 6 月在院的 OSCC 手术患者的手术标本和病理报告，其中手术标本包括部分 OSCC 原发灶和癌旁组织（原发灶外 1cm）。排除标准为：①患者为肿瘤复发者。②OSCC 继发于全身肿瘤转移。③既往放疗、化疗史。④HPV 病毒感染史。⑤全身有重大系统性疾病患者。我们本次共收集 30 对口腔鳞癌和癌旁组织，短期于-80℃冰箱中保存。依据美国癌症联合会第八版（AJCC8）头颈肿瘤分期指南，将所有患者标本分为早期组（I-II）和晚期组（III-IV）。患者标本的详细信息归纳于表 1。我们根据有无 PNI 将标本分为两份，病理报告显示 30 份标本中有 11 例发生 PNI。因我院病理报告未强制要求报告是否有 PNI，因此我们对 PNI 阴性标本进行了免疫组织化学染色（IHC）和免疫荧光染色（IF）复查。根据相关文献报道，采用 S100 抗体染色肿瘤标本可使 PNI 检出率从 30%提高到 82%^[25]。S100 家族由含 α 和 β 亚基的各种组合组成，最常见

S100A (α - α) 或 S100B (α - β 和 β - β) 亚型。S100B 不仅可以染色神经轮廓, 还可以在 SCs 内外表达。为了在染色 PNI 的同时观测施万细胞分布情况, 我们选用了 S100B 抗体染色 OSCC 标本。最后, 我们将病理结果和标本染色结果为 PNI 的患者进行了汇总与统计。

表 1 30 例 OSCC 患者信息

Table 1 Information of 30 patients with OSCC

分组	类别	例数	百分比
年龄 (岁)	< 60	15	50.00%
	≥ 60	15	50.00%
性别	男性	21	70.00%
	女性	9	30.00%
部位	颊	7	23.33%
	舌	16	53.33%
	牙龈	3	10.00%
	口底	4	13.34%
病理分型	低分化	5	16.67%
	中分化	10	33.33%
	高分化	15	50.00%
临床分期	I-II	12	40.00%
	III-IV	18	60.00%
淋巴结转移	阴性	17	56.67%
	阳性	13	43.33%

1.2.2 标本制备与染色

(1) 标本制备

将 OSCC 原发灶与癌旁组织 (肿瘤外 1cm) 置于室温中解冻后分别进行切块。取 1*0.5*1cm 大小的组织 (包含完整上皮结构和上皮间质) 用于切片染色; 另取约 20mg 重量的组织用于提取 RNA。将肿瘤组织和癌旁组织分别放入 4% 的多聚甲醛中固定 24h, 然后流水冲洗过夜。使用梯度浓度【75%, 85%, 95% (I), 95% (II), 95% (III), 100% (I), 100% (II), 100% (III)】酒精脱水 (每个步骤各 60min),

二甲苯透明两次，每次 60min。石蜡包埋，切片（厚度约 5 μ m，包含完整上皮结构和上皮下间质）并于载玻片上做好标记，烤片后备用。

（2）免疫荧光染色

使用上述切片再次于 60–65℃烤箱中烤片约 60–90min，按以下步骤进行免疫荧光染色。

①脱蜡水化：将切片按顺序置于二甲苯（I）10min、二甲苯（II）10min、无水乙醇（I）5min、无水乙醇（II）5min、95%乙醇 5min 和 85%乙醇 5min 中进行脱水与水化，最后使用蒸馏水清洗。

②抗原修复：使用 EDTA 抗原修复缓冲液（PH9.0）处理组织切片，并将其置于微波炉内进行抗原修复。中火煮沸后断电间隔 10min 中低火至沸，尽量减少缓冲液蒸发，保持切片湿润，待其自然冷却后放入 PBS 中，在摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

③BSA 封闭：取出切片甩去多余水分并使用纸巾吸去组织周围剩余水分，快速使用免疫组化笔圈出组织标本（首尾闭合并避开组织标本）并滴加 3%BSA 封闭液覆盖圈内组织，室温下反应 30min。

④孵育一抗：甩去封闭液，滴加使用 PBS 稀释的兔源 S100B 一抗稀释液（1:300）于圈内组织后放于湿盒中，在 4℃冰箱内过夜。

⑤孵育二抗：将切片放入 PBS 中洗涤 5min*3 次，稍微甩干切片后于圈内组织上滴加抗兔荧光二抗覆盖组织，室温下湿盒内避光孵育 50min。

⑥DAPI 复染细胞核：将切片置于 PBS 中洗 3 次，每次 5min。稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育约 10min。

⑦封片：将切片置于 PBS 中洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后使用抗荧光淬灭封片剂封片。

⑧拍照：将切片置于倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

（3）免疫组化染色

①②同上

③去除内源性过氧化物酶：免疫组化笔将组织圈出，滴加 3%的 H₂O₂ 后在 37℃恒温箱中孵育 10min，将切片放在 PBS 中浸泡 5min*3 次。

④封闭：滴加 10%山羊血清，在 37℃恒温箱中孵育 30min。

⑤孵育抗体：甩去封闭液，滴加使用 PBS 稀释的兔源 S100B 一抗稀释液(1:300)于圈内组织后放于湿盒中，在 4℃冰箱内过夜。切片室温复温 60min，PBS 漂洗 5min*3 次后滴加二抗室温孵育 60min，PBS 漂洗 5min*3 次。

⑥DAB 显色：滴加二氨基联苯胺（DAB）显色剂，见到切片变成棕色后，立即放入 PBS 中终止染色，PBS 漂洗 3min*3 次。

⑦复染：苏木素复染 30s-3min，自来水冲洗去掉残余染料。

⑧脱水、透明：75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇（I）、无水乙醇（II）依次脱水切片。二甲苯透明 2 次，每次 5s。

⑨封片：中性树胶封片，晾干后镜检。

1.2.3 实时荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR)

(1) RNA 提取

将从 OSCC 组织和癌旁组织切取的约 20mg 组织分别置于液氮中研磨成粉末，然后使用碧云天“RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒（离心柱式）”按照说明书步骤提取 RNA。

(2) RNA 逆转录

①检测 RNA 浓度：使用 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度，双蒸水调零仪器，通过测量在 260nm 波长的吸光度换算 RNA 浓度，确保 A260/A280 范围为 1.9-2.1 和 A260/A230 大于 2.0 为有效 RNA 提取物。

②逆转录：使用 产品 TaKaRa 一步法的 10 μl 逆转录体系，按以下方法配制逆转录

录混合物。

5×MIX	2 μl	}	共 10 μl，其中 x=（500/RNA 浓度） μl
RNA 提取物	x μl		

RNase-free water (8-x) μl

将 10 μl 录混合物分别放入放入逆转录仪，按照 TaKaRa 说明书建议设置逆转录程序，并开始逆转录。

③样品的稀释与保存：将 10 μl 逆转录产物加入 90 μl DEPC 水进行稀释得到最终 50ng/μl 的 cDNA 样品。将样品存放于-20℃冰箱内短期储存。

(3) qRT-PCR

①使用 ABclonal 10 μ l 体系按照表 2 配方配制上样混合物。选择人 Actin beta 作为内参。所涉及的引物设计序列见表 3。

表 2 qRT-PCR 反应体系
Table 2 qRT-PCR reaction system

试剂	用量 (μ l)
SYBR Green	5
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
RNase-free water	2.2
cDNA	2
Total Volume	10

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequence

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Actin- β	TCACCCACACTGTGCCCAT	CAGCGGAACCGCTCATTGCCA
IL-1 β	GAAATGATGGCTTATTACAG	TTGCTGTAGTGGTGGTCGGAG
IL-6	GGCCCTTGCTTTCTCTTCG	ATAATAAAGTTTTGATTATGT
IL-8	GTGCTGTGTTGAATTACGG	TTGACTGTGGAGTTTTGGC
IL-10	GAGAGAAGCTGAAGACCCT	TCATTCATGGCCTTGTAGACA
TNF- α	CACAGTGAAGTGCTGGCAA	CACAGTGAAGTGCTGGCAAC

②qRT-PCR 程序

95.0 $^{\circ}$ C --1min30s; 95.0 $^{\circ}$ C --5s; 60.0 $^{\circ}$ C --34s; GOTO 2 , 39 次循环以上; 95.0 $^{\circ}$ C-- 10s; Melt Curve 65. $^{\circ}$ C to 95.0 $^{\circ}$ C; END。

③数据处理

排除掉组内 cq 值差距大于 0.5 的值, 以 2- $\Delta\Delta$ 法计算, 将最终结果导入 Prism10 进行差异性分析统计。

1.2.4 统计学分析

在针对 OSCC 部位与 PNI 发生是否存在关联的研究中，因我们的总样本量过少，采取多元逻辑回归或者 Kruskal-Wallis 检验进行分析可能导致统计功效下降，从而影响检测到差异的能力。因此，我们选择了 Fisher 确切概率法模型研究这个统计学问题，并将数据导入 SPSS22.0 进行统计学分析。本研究中所涉及的其他研究内容每组实验至少重复三次 ($n \geq 3$)，实验结果（归一化或不归一化）使用 GraphPad Prism 10 和 Image J 等软件进行分析处理。采用 t 检验或单因素方差分析来研究实验结果。检验水准 $\alpha = 0.05$ ，即 $P < 0.05$ 则数据具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ， $****P < 0.0001$ ，ns: 无统计学意义。

2 实验结果

2.1 OSCC 显示出高 PNI 发生率，呈现出部位差异性

在最终的统计结果中，30 例 OSCC 患者中共有 16 例发生 PNI，发生率高达 53.3%。且 Fisher 确切概率法研究结果发现，PNI 在 OSCC 中的发生与部位有关 ($P < 0.001$ ，表 4、表 6)，其中舌的 PNI 发生率高达 87.5%。而 Fisher 确切概率法统计结果发现，是否发生 PNI 与 OSCC 的临床分期无关 ($P > 0.05$ ，表 5、表 7)。

表 4 OSCC 患者发生 PNI 与肿瘤部位的关系

Table 4 Relationship between PNI and tumor sites in patients with OSCC

Table 1. Relationship between PNI and tumor sites in patients with OSCC					
			是否发生 PNI		总计
			否	是	
部位	颊	计数	6	1	7
		百分比	85.7%	14.3%	100.0%
	口底	计数	3	1	4
		百分比	75.0%	25.0%	100.0%
	舌	计数	2	14	16
		百分比	12.5%	87.5%	100.0%
	牙龈	计数	3	0	3
		百分比	100.0%	0.0%	100.0%
总计	计数	14	16	30	

百分比	46.7%	53.3%	100.0%
-----	-------	-------	--------

表 5 OSCC 患者发生 PNI 与肿瘤分期的关系

Table 5 Relationship between PNI occurrence and tumor stage in OSCC patients

		是否发生 PNI		总计	
		否	是		
分期	早期 (I-II)	计数	6	7	13
		百分比	46.2%	53.8%	100.0%
	晚期 (III-IV)	计数	8	9	17
		百分比	47.1%	52.9%	100.0%
	总计	计数	14	16	30
		百分比	46.7%	53.3%	100.0%

表 6 PNI 与肿瘤部位的卡方检验结果

Table 6 Chi-square test results of PNI and tumor site

项目	值	自由度	渐近显著性 (双向)
皮尔逊卡方	16.511 ^a	3	.000
似然比 (L)	19.158	3	.000
Fisher 精确检验	16.207		.000
有效个案数	30		

a. 6 个单元格 (75.0%) 具有的预期计数少于 5。最小预期计数为 1.40。

表 7 PNI 与临床分期的卡方检验结果

Table 7 Chi-square test results of PNI and clinical stage

项目	值	自由度	渐近显著性 (双向)	精确显著性 (双向)	精确显著性 (单向)
皮尔逊卡方	.002 ^a	1	.961		
连续校正 ^b	.000	1	1.000		
似然比 (L)	.002	1	.961		
Fisher 精确检验				1.000	.626
有效个案数	30				

a. 0 个单元格 (0%) 具有的预期计数少于 5。最小预期计数为 6.07。

b. 仅为 2×2 表格计算

2.2 PNI 相关 OSCC 肿瘤中心 S100B 表达高于癌旁正常组织

我们对 PNI 标本进行 IHC 和 IF 染色发现,在发生 PNI 的 OSCC 患者标本中,肿瘤中心的 S100B 表达明显高于癌旁组织,意味着更多数量的 SCs 浸润(图 1)。

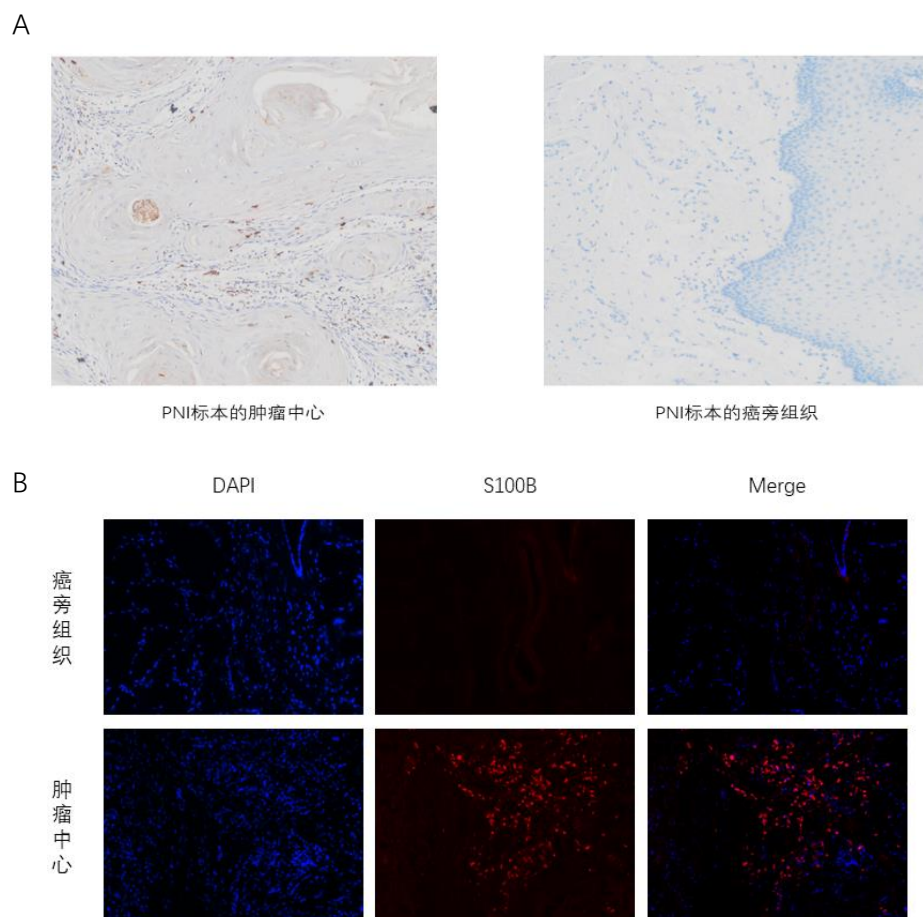


图 1 PNI 患者肿瘤中心与癌旁组织的 IHC 和 IF 染色。(A) PNI 患者肿瘤中心的 IHC 染色可见癌巢中的神经浸润。(B) IF 可见肿瘤中心大量 S100B 信号。

FIG. 1 IHC and IF staining of tumor center and adjacent tissues in PNI patients. (A) IHC staining in the tumor center of PNI patients shows nerve infiltration in the cancer nest. (B) IF shows a large number of S100B signals can be seen in the tumor center.

2.3 PNI 肿瘤标本中肿瘤中心的炎症水平高于癌旁组织

基于足量对于 SCs、PNI 与肿瘤关系的研究发现, PNI 中的 SCs 在一定程度上可以改变 TME 的炎症水平。为了进一步研究这一问题,我们用癌旁组织代替正常组织,使用 qRT-PCR 对 PNI 相关的肿瘤中心组织和癌旁正常组织的炎症水平进行

分析。结果发现，肿瘤中心（CA）比癌旁组织（NC）表达更多的 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 等炎症因子（图 2）。

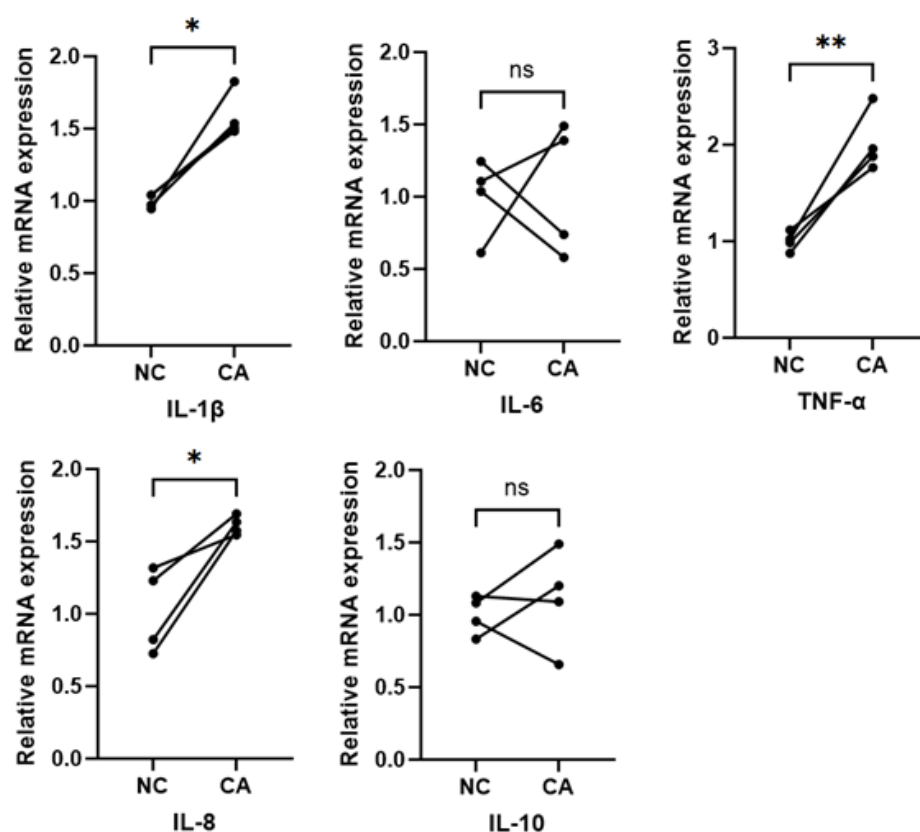


图 2 PNI 患者肿瘤中心比癌旁正常组织表达更高水平的促炎基因（IL-1 β 、IL-8、TNF- α ）。

Figure 2 The tumor center of PNI patients express higher levels of proinflammatory genes (IL-1 β , IL-8, TNF- α) than the adjacent normal tissue.

3 讨论

在恶性肿瘤中，TME 内各组分相互作用，对肿瘤细胞的增殖、侵袭发挥着重要的促进作用。近年来，学者们发现 TME 中的神经成分与肿瘤存在复杂的信号串扰。肿瘤-神经串扰模式分为肿瘤神经周围浸润（PNI）和肿瘤神经支配^[6]。肿瘤神经支配是指肿瘤可以将周围神经募集到 TME，而 PNI 在近年来被理解为癌细胞沿着神经束膜侵入并迁移到神经内膜。这两种模式最终都通过 TME 中癌细胞与神经间的信号交互来干扰肿瘤进程，而大量的研究确实发现 PNI 能不同程度地促进各类肿瘤进展。Pacheco C 等人通过足量 OSCC 标本发现，OSCC 肿瘤内的神经密度

与更差的肿瘤预后呈现出正向关系^[26]。在此基础上,我们对肿瘤中心和癌旁正常组织(肿瘤外 1cm 组织)的研究中初步发现,肿瘤中心表现出更高 S100B 水平,预示着更高的神经密度和 SCs 水平。此外,本研究中的 30 例 OSCC 患者 PNI 发生率高达 53.3%,并且呈现出部位差异性,其中舌的 PNI 发生率更是高达 87.5%。而这些发现可能有助于预测 OSCC 的预后情况。

在胃癌和胰腺癌等多种恶性肿瘤中的研究中已经发现 PNI 与肿瘤内的炎症水平相关^[27; 28]。为了进一步描述 OSCC 中 PNI 的部位差异,我们将 PNI 与 OSCC 瘤内和癌旁的炎症联系起来。而我们的研究结果也刚好发现 OSCC 中心比癌旁组织表现出更高水平的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-8 等炎性因子的基因表达。恰好这些炎性因子在恶性肿瘤的进展中起到不可忽视的促进作用。

综上所述,PNI 在预测 OSCC 预后这一方面有着广阔的前景,而其中的分子信号机制却欠缺研究探讨。SCs 作为 PNS 最重要的成分,在胰腺癌的 PNI 过程中起到了重要作用并导致更差的预后^[29]。对此,我们认为 SCs 对于 PNI 相关 OSCC 也有着类似的促进作用。因而明确 OSCC 在 SCs 条件下的表观特征以及解释 SCs 在口腔鳞癌微环境中发生怎样的信号交互对于改进和探索新的 OSCC 治疗方案至关重要。

第二部分 SCs 促进肿瘤增殖、迁移、侵袭和 EMT

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

试剂名称	厂商	产地
DMEM 高糖培养基	gibco	美国
0.25%胰酶消化液	dowobio	中国
青链霉素混合液	dowobio	中国
PBS 缓冲液（细胞级）	dowobio	中国
2.0ml 外旋冻存管	Thermo	美国
FBS	lonsera	澳大利亚
6 孔板	mengbio	中国
10cm 细胞培养皿	mengbio	中国
TBST(10X)	dowobio	中国
DEPC	dowobio	中国
8.0um 一次性细胞嵌入皿	JET	中国
0.4um 一次性细胞嵌入皿	JET	中国
PAGE 凝胶试剂盒	碧云天	中国
MATRIGEL MATRIX	康宁	美国
彩色预染标准分子量蛋白	博奥龙	中国
Marker		
兔源 E- Cadherin 抗体	Bioss	中国
兔源 N- Cadherin 抗体	Bioss	中国
兔源 Vimentin 抗体	Bioss	中国
兔源 P65 抗体	正能	中国
兔源 PP65（SER536）抗体	正能	中国

袋装吸头	JET	中国
山羊抗兔 IgG/辣根酶标记	北京中杉	中国
RSC-96 大鼠施万细胞系	普诺赛	中国
人口腔（舌）鳞癌 HSC-3 细胞株	中科院细胞库	中国
BeyoECL Moon (显影液)	碧云天	中国
DMSO	Solarbio	中国
CCK-8 试剂盒	碧云天	中国

1.1.2 主要仪器

仪器名称	厂商	产地
超净工作台	Haier	中国
超速离心机	Thermo Scientific	美国
低速离心机	Thermo Scientific	美国
CO2 细胞孵箱	Thermo Scientific	美国
显影仪	Bio-Rad	美国
酶标仪	Molecular Devices	中国
PCR 仪	Bio-Rad	美国
电泳仪/转膜仪	BIO-RAD	美国
4℃冰箱	Haier	中国
程序性渐冻盒	Biosharp	中国

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的选择与培养

基于 OSCC 中舌高发 PNI 的现象，我们选择人舌鳞状细胞癌细胞 HSC-3 来作为本次研究的肿瘤细胞。因原代施万细胞的提取和纯化难度极大，价格昂贵，因此我们选择了大鼠施万细胞系 RSC-96 作为本次研究的 SCs。该 RSC-96 购买自武汉普诺赛生物。该两种细胞系均使用含有胎牛血清(FBS)的完全培养基(10%FBS+90%

高糖 DMEM+1%青霉素/链霉素), 并放入 5%CO₂ 的 37℃ 孵育箱中培养。整个实验过程中以细胞到手开始, 最多传至 P9 (第九代)。

①细胞复苏: 预先在 15ml 离心管中准备好 1ml 完全培养基, 从液氮罐中取出相应细胞后迅速放入 37℃ 水浴缸中解冻, 待冻存管中的冰块融化约三分之二时迅速消毒并转入超净台中吸出细胞悬液并加入到预先准备的完全培养基中, 于 1000rpm 的转速下离心 5min。弃上清液, 加入 1ml 完全培养基重悬细胞后将细胞移入装有 7ml 完全培养基的 10cm 细胞培养皿中, 放入细胞孵育箱中继续培养。

②细胞换液与传代: 当细胞汇合度达到 75%-85%时弃掉旧培养基, 加入 2ml PBS 到培养皿中洗去剩余培养基, 重复洗涤一次后加入 2ml 胰蛋白酶摇匀后立即放入 5%CO₂ 的 37℃ 孵育箱中消化细胞 (其中 HSC-3 消化约 3.5min, RSC-96 消化约 2min)。显微镜下观察细胞变大、变圆后立即转入超净台中加入 2ml 完全培养基终止消化, 并在 1200rpm/min 条件下离心 4min。弃上清后加入适量完全培养基重悬细胞, 按一定比例传代 (其中 HSC-3 按 1:2-1:3, RSC-96 按 1:3-1:4), 并放入细胞孵育箱中培养。每天观察细胞状态, 视情况更换一半或全部更换细胞培养基, 并于 36h-48h 时间范围内对细胞进行传达或冻存。

③细胞冻存: 当细胞汇合度达到 70-80%后我们便可对细胞进行冻存。预先配置冻存液并准备冻存管。冻存液采用 90%FBS+10%DMSO 的比例配置。按上述相同办法获取消化离心后的细胞, 弃上清后加入适量冻存液重悬细胞 (HSC-3 按 2.5×10^6 个细胞/ml, RSC-96 按 5×10^6 个细胞/ml 的比例加入冻存液)。每支冻存管加入 1ml 细胞悬液并装进程序降温盒放入 -80℃ 冰箱中冻存一天后转入液氮罐中长期冻存。

1.2.2 共培育系统的建立和条件培养基的收集

为了研究 SCs 与 OSCC 细胞的相互影响, 我们构建了非接触式的共培养系统, 图 3。我们将 1×10^6 个 RSC-96 细胞接种于下室的六孔板上, 将 0.5×10^6 个 HSC-3 细胞接种于底层膜直径为 0.4um 的小室插入物中, 并将小室插入六孔板上方。细胞接种过夜后将上下室的培养液弃去并加入 DMEM 继续培养。共培养系统继续培养 36h 后可收集共培养 HSC-3 条件培养液和共培养 RSC-96 条件培养液, 在 4℃ /2000g 条件下离心 10min 并使用 0.22mm 过滤器过滤, 最终得到共培养 HSC-3 条件培养基 (记为 co-HCM) 和共培养 RSC-96 条件培养基 (记为 co-RCM); 孔

板和小室中的细胞可用于提取 RNA 和蛋白，同时记录为 co-HCM 组和 co-RCM 组。

同样的，我们将相同数量的 HSC-3 和 RSC-96 分别接种于普通 6 孔板中过夜，细胞贴壁后弃培养液并加入 DMEM 继续培养 36h，按上述方法处理并收取 HSC-3 条件培养基（HCM）和 RSC-96 条件培养基（RCM），孔板中的细胞用于提取 RNA 和蛋白，并记录为 HCM 组和 RCM 组。所有的条件培养基在 4℃ 下 3 天内使用，或放于 -80℃ 冰箱最多储存 1 月。

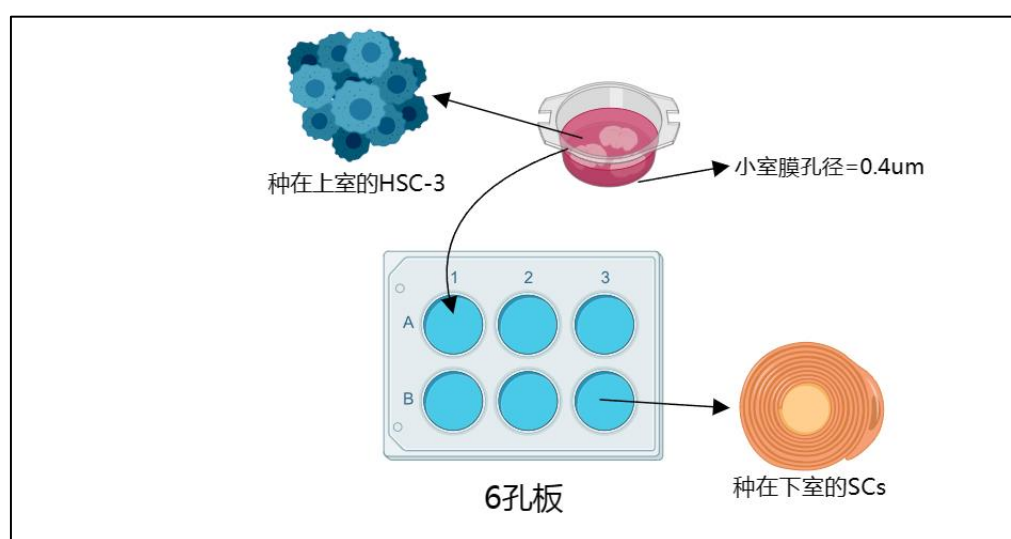


图 3 SCs 与 HSC-3 的共培养系统模式图。

Figure 3. Model of co-culture system of SCs and HSC-3.

1.2.3 划痕实验

我们通过在相同时间内观测细胞的伤口愈合情况来评估细胞在 2 维平面下的迁移能力。将 1.5×10^6 个细胞接种在 6 孔板中培养，待细胞汇合度达到 95% 后用 1ul 移液枪尖垂直于孔板底部，均匀适当用力划出细胞间隙。将旧培养液弃去后用 PBS 清洗孔板 3-4 次洗去脱落悬浮的细胞，加入不同的条件培养基来刺激肿瘤细胞。在 0h, 24h, 36h 时于显微镜下拍照并观察细胞伤口愈合情况，将结果导入 ImageJ 软件分析愈合比率 $(\%) = (1 - \text{观察时的未愈合面积} / 0\text{h 的未愈合面积}) \times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 迁移、侵袭实验

为了研究肿瘤在 3 维平面的迁移、侵袭能力，我们采用 Transwell 迁移、侵袭实验模型进行评估。将 200μl, 4 万个 DMEM 重悬的 HSC-3 接种于底部膜孔径为

8 μ m 的小室插入物中, (侵袭实验采用 1:8 稀释后的 Matrigel 胶预先铺胶) 下层加入含相同浓度 FBS 的不同类型条件培养基 500 μ l。于 24h (迁移) 和 36h (侵袭) 后去除培养液并使用 4%多聚甲醛固定细胞 15min, 去除上室未通过底膜的细胞, 1%结晶紫染色 10min, 双蒸水洗去浮色, 并将小室晾干后置于载玻片上在倒置显微镜下观察细胞迁移或侵袭的数量, 最后将结果导入 ImageJ 软件进行分析处理。

1.2.5 CCK-8 增殖实验

为了评估不同类型条件培养基对于肿瘤细胞增殖能力的影响, 我们使 CCK-8 增殖实验。将 2000 个细胞种在 96 孔板中过夜, 次日去除旧培养液, 加入不同类型的条件培养基继续培养 24h。最后将 CCK-8 试剂按 10 μ l/孔加入到孔板中孵育 2h, 最后避光将孔板放入酶标仪中检测在 450nm 处每个孔的吸光度值 (OD)。将结果去除空白对照后做归一化处理, 并将结果导入 Prism 进行统计学分析。

1.2.6 裸鼠体内皮下成瘤实验

为了研究 co-RCM 和 RCM 对 OSCC 细胞的活化作用, 我们构建了裸鼠体内皮下成瘤实验。预先分别使用 DMEM、co-RCM 和 RCM 处理 HSC-3 细胞 36h。将细胞离心后使用 PBS 重悬细胞。将不同组别的肿瘤细胞按 500 万个 HSC-3/位点的比例打入裸鼠前肢腋下周围的皮下组织, 每日观察裸鼠的行为、状态和肿瘤大小, 待肿瘤长到一定大小后处死老鼠并测量肿瘤体积大小, 将肿瘤固定后进行切片, HE 染色观察癌巢和核分裂像。

1.2.7 HE 染色

石蜡切片的制备同第一部分的 IHC 部分。再次将切片烤片 60min 后按下面的步骤进行 HE 染色。

脱蜡和水化: 依次放入二甲苯 (I) 5min、二甲苯 (II) 5min, 100%乙醇 5min, 90%乙醇 2min, 80%乙醇 2min, 双蒸水 2min。

苏木素染色: 将切片放入苏木素约 30s, 自来水洗掉残余染料。

分化: 用含 0.5%盐酸的 75%酒精分化切片约 30s, 自来水洗净。

返蓝: 将切片放入自来水中浸泡 5-10min。

伊红染色: 滴加伊红染液反应 5min, 自来水洗净。

脱水: 切片放入无水乙醇 (I) 5min、无水乙醇 (II) min。

透明: 切片放入二甲苯中 10min 透明。

封片镜检：组织外滴加中性树脂，盖玻片封片，晾干后显微镜下观察并采集图像。

1.2.8 qRT-PCR

我们通过使用 qRT-PCR 来分析肿瘤细胞的上皮间充质转化（EMT）相关基因的表达，包括 E-Cadherin、N- Cadherin 和 Vimentin。方法和步骤同第一部分。内参基因选择人 GAPDH。引物序列见下表。

表 8 引物序列
Table 8 Primer sequence

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	CACTCCTCCACCTTTGACGC	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
E-Cadherin	GAAAGCGGCTGATACTGACC	CGTACATGTCAGCCGCTTC
N- Cadherin	ATGTGCCGGATAGCGGGA	TCAGTCATCACCACCACCAT
Vimentin	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT

1.2.9 蛋白质印迹（WB）

按照共培养系统的收样时间对共培养的 HSC-3、单独培养的 HSC-3 和加入 RCM 刺激后的 HSC-3 细胞进行蛋白质提取和 WB 实验。

（1）在冰上提取细胞蛋白并测量浓度

- ① 6 孔板或共培养小室弃去培养液，加入预冷后的 PBS 洗涤细胞 3 次。
- ② 每孔加 100 μ l 含蛋白酶抑制剂（PMSF）的 RIPA 裂解液（PMSF：RIPA=1:50），冰上裂解 15min 后用细胞刮刀刮下并收集至 EP 管中。
- ③ 使用超声细胞破碎仪，破碎细胞 20 min。
- ④ 含样品的 EP 管以 12000 rpm 的转速在 4℃ 条件下离心。收集上清液至新的 EP 管中。

（2）A280 测定蛋白浓度：

- ① 在紫外分光光度计的界面选择“蛋白”标签，以 A280 作为检测参数。
- ② 选择样品类别并进行基线校正。
- ③ 滴加 1ulDEPC 水至基座上，降下检测臂。
- ④ 点击 blank，等待检测完成。

- ⑤ 抬起检测臂，用无尘纸巾擦拭上下基座。
- ⑥ 滴加 1ul 样品至基座上，降下检测臂，点击检测测量并记录数值。
- ⑦ 重复步骤⑤，继续滴加新的样品进行检测。

选择 1Abs=1mg/ml 即可粗略估计蛋白质浓度。加入适量 RIPA 使得各组别蛋白浓度一致。所得样品中加入 5*浓度的蛋白上样缓冲液并稀释为 1*，将混合溶液放置在 100℃金属浴中煮 10min，并将所得样品放入-80℃冰箱中短期储存。

(3) SDS-PAGE 凝胶电泳:

① SDS-PAGE 凝胶配制: 清洗并干燥玻璃板。按照碧云天一步法快速凝胶试剂盒的说明书配制相应浓度的凝胶，上层胶中快速插入梳子，约 30min 凝胶凝固便可取下梳子加样。

② 加样: 在样本两侧泳道加入 4 μ l Marker，并在中间泳道分别加入约含 20ug 总蛋白的样品。

③ 电泳: 首先恒压 80 V 30 min 压平蛋白条带; 待样品跑至下层胶后再恒压 120V 跑约 60min 分开条带，待自己所需要的条带分离后结束电泳。

④ 转膜: 电泳完成后，在转膜液中根据目标蛋白的分子量裁剪凝胶。甲醇激活 PVDF 膜 10 min，按照黑色夹板-海绵-3 层滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-透明夹板的顺序放置转膜体系。然后将转膜架装入转膜槽。在冰盒中恒流 200mA 转膜 90min。

⑤ 封闭: 转膜完成后将 PVDF 膜放于含 5%脱脂奶粉的 TBST 中并置于摇床上室温封闭 2 h。

⑥ 一抗孵育: TBST 洗去 PVDF 膜上残留的脱脂奶粉，按照所需条带分子量裁剪 PVDF 膜，将膜浸于所对应的一抗中，4 ℃摇床上过夜。

⑦ 孵育二抗: 回收一抗，将 PVDF 膜放入 TBST 中置于摇床上洗膜，3 次*10min。加入适量对应一抗种属的二抗 (1:5000)，室温孵育 2h。

⑧ 显影: 将 PVDF 膜放入 TBST 中置于摇床上洗膜，3 次*10min。按碧云天试剂盒说明书配制显影液，在显影仪上曝光、拍照。

2 实验结果

2.1 共培养 SCs 促进 OSCC 细胞增殖

我们通过分别使用 DMEM、RCM、co-RCM 处理提前种在 96 孔板中的 HSC-3 细胞，24 小时后加入 CCK-8 试剂孵育 2h 后对 3 个组的相对 OD 值进行了统计学分析，发现 co-RCM 可以促进 HSC-3 的增殖；而单纯的 RSC-96 培养基 RCM 却不能刺激 HSC-3 的增殖（见图 4A）。同时，我们对 RSC-96 做了类似的实验，结果发现 HCM 和 co-HCM 均不能促进 RSC-96 的增殖（图 4B）。

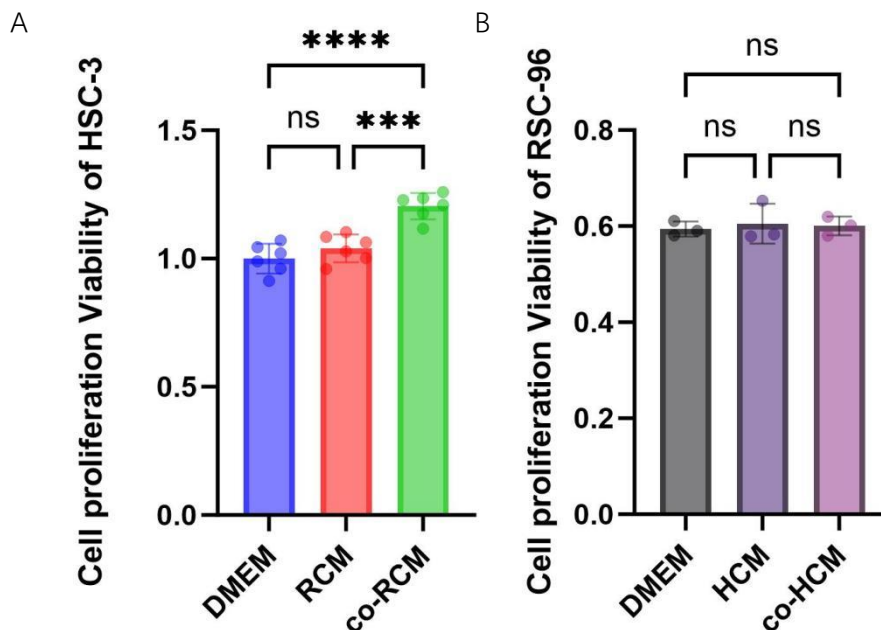


图 4 SCs 共培养培养基促进 OSCC 增殖。(A) 单独使用 RSC-96 培养基培养 HSC-3 细胞对其的增殖无影响 ($P=0.4310$)，而与 HSC-3 共培养的 RSC-96 培养基能够明显促进 HSC-3 细胞的增殖 ($P<0.0001$)。(B) 无论是单独的 HSC-3 培养基 ($P=0.8838$)，还是与 RSC-96 共培养的 HSC-3 培养基 ($P=0.9568$) 均不能影响 RSC-96 的增殖能力。

Figure 4. SCs co-culture medium promotes OSCC proliferation. (A) RSC-96 culture medium alone had no effect on the proliferation of HSC-3 cells ($P=0.4310$), while RSC-96 culture medium co-cultured with HSC-3 could significantly promotes the proliferation of HSC-3 cells ($P<0.0001$). (B) Neither HSC-3 medium alone ($P=0.8838$) nor HSC-3 medium co-cultured with RSC-96 ($P=0.9568$) could affect the proliferation capacity of RSC-96.

2.2 SCs 在二维平面促进 OSCC 细胞的迁移

同样的, 我们分别使用 DMEM、RCM、co-RCM 三种培养基处理汇合度达 95% 的 HSC-3 细胞, 并予以划痕创伤处理, 观察 24h 后的 HSC-3 创口愈合比率。结果发现 RCM 和 co-RCM 能在不同程度上促进肿瘤细胞的创伤愈合 (图 5)。

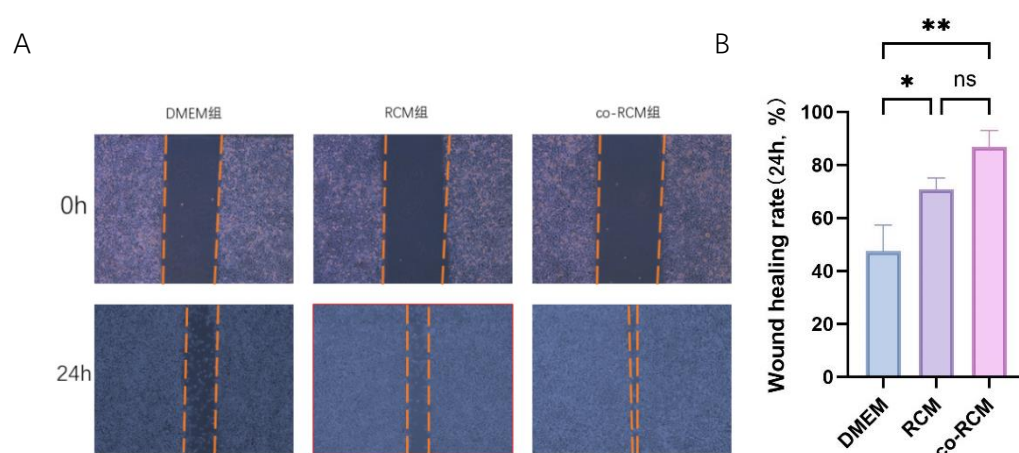


图 5 SCs 促进 OSCC 细胞在二维平面的迁移能力。(A) HSC-3 分别在 DMEM、RCM 和 co-RCM 中的二维迁移情况, 24h 的平均迁移率分别为 47.47%、70.87% 和 86.87%。(B) 单纯的施万细胞培养基 ($P=0.0167$) 和与 HSC-3 共培养的施万细胞培养基均能促进肿瘤的迁移能力 ($P=0.0013$, $n=3$)。

Figure 5. SCs promote the ability of the migration of OSCC cells in two-dimensional plane. (A) The two-dimensional migration of HSC-3 in DMEM, RCM and co-RCM was 47.47%, 70.87% and 86.87%, respectively. (B) Both Schwann cell culture-medium alone ($P=0.0167$) and Schwann cell culture-medium co-cultured with HSC-3 promoted tumor migration ($P=0.0013$, $n=3$).

2.3 SCs 在三维平面促进 OSCC 细胞的迁移和增殖

通过 Transwell 实验发现, 在三维平面下受到下室共培养 SCs 培养基成分的引诱作用, HSC-3 表现出更强的迁移和侵袭能力 (图 6)。此外, 我们的研究发现, 虽然单纯的 SCs 培养基便能促进 HSC-3 的迁移和侵袭能力, 但是与肿瘤细胞共培养后的 SCs 无疑表现出了对肿瘤细胞更强的引诱作用。

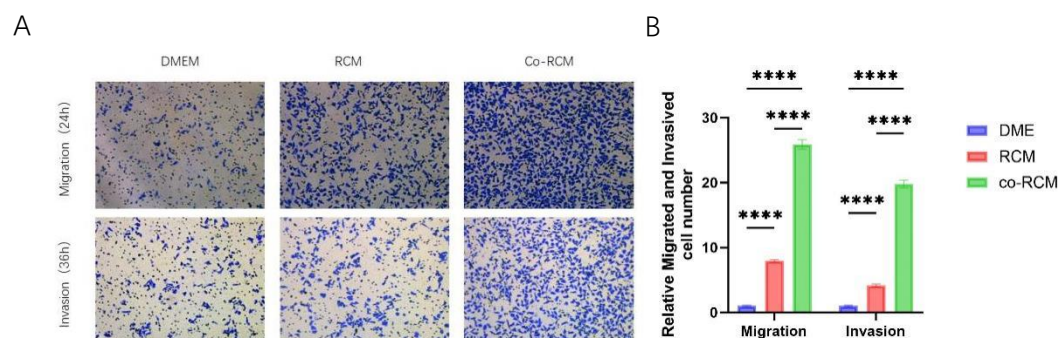
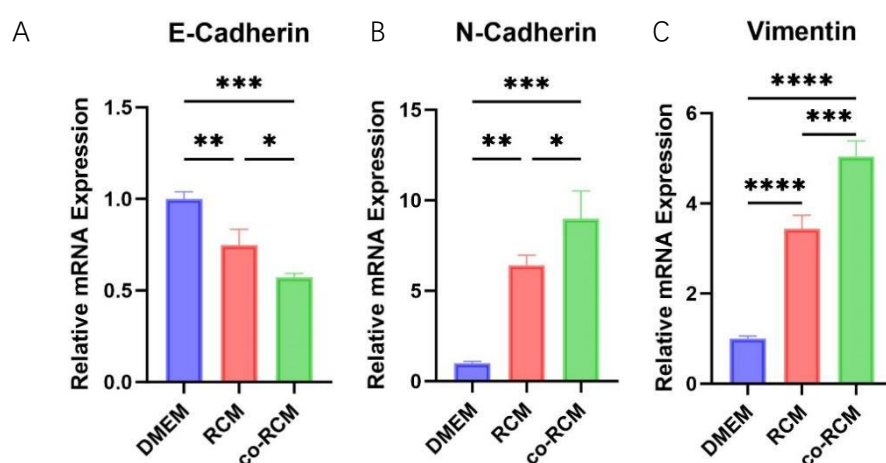


图 6 SCs 条件培养基在三维平面上促进肿瘤迁移和侵袭。(A) 下室中加入 RCM 和 co-RCM 后 HSC-3 的迁移与侵袭情况。(B) RCM 和 co-RCM 均能促进 HSC-3 的迁移和侵袭, 并且 co-RCM 表现出更强的促进作用。

Figure 6 SCs conditioned medium promotes tumor migration and invasion on a three-dimensional plane. (A) Migration and invasion of HSC-3 after the addition of RCM and co-RCM to the lower chamber. (B) Both RCM and co-RCM can promote HSC-3 migration and invasion, and co-RCM has a stronger promoting effect.

2.4 SCs 在体外促进 OSCC 的 EMT 过程

上皮间充质转变 (EMT) 是上皮细胞通过一系列程序转变为具有间质细胞特性的生物学过程, 同时也是上皮源性肿瘤发生迁移和侵袭的重要潜在机制。EMT 主要体现为 E-Cadherin 等细胞黏附因子的表达降低, 并上升 N-Cadherin 和 Vimentin 等间充质标志物。我们的迁移和侵袭实验发现通过共培养 SCs 培养基的激活, OSCC 细胞获得了更强的迁移和侵袭能力。为了进一步研究此现象是否与肿瘤细胞的 EMT 过程有关, 我们使用 qRT-PCR 检测不同 CM 刺激下 HSC-3 的 EMT 相关 mRNA 水平。结果发现 RCM 和 co-RCM 均能在不同程度上降低 HSC-3 细胞 E-Cadherin 的表达水平, 并上升 N-Cadherin 和 Vimentin 的表达 (图 7)。我们随后对各组别 HSC-3 细胞内的蛋白水平进行了蛋白质印迹 (WB) 实验分析, 得到了与 qRT-PCR 类似的结果。



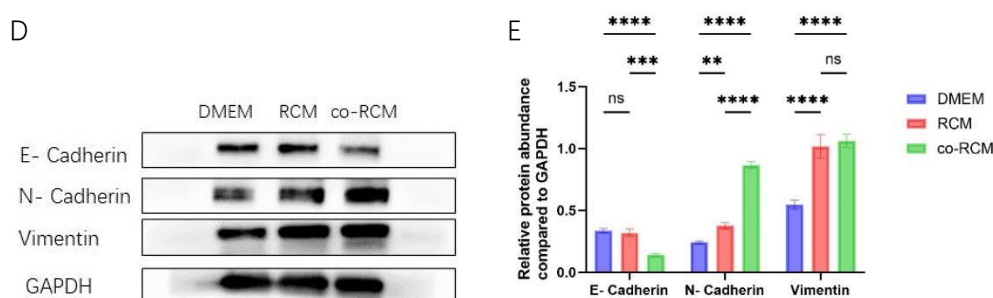


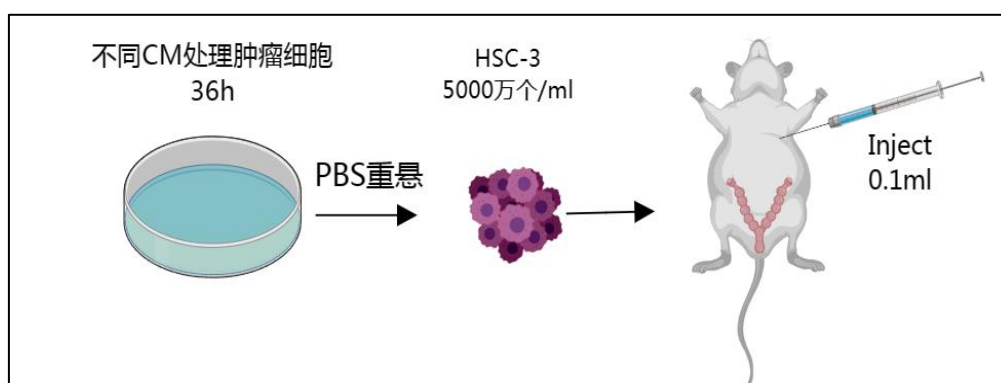
图 7 SCs 促进 OSCC 细胞的 EMT 过程。(A-C) 不同条件培养基处理下, EMT 相关的 E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 在 HSC-3 中的相对表达水平。(D-E) 不同条件培养基处理下, HSC-3 中 EMT 相关蛋白相对于内参蛋白 GAPDH 的表达水平。

Figure 7 SCs promote EMT process of OSCC cells. (A-C) The relative expression levels of EMT-related E-Cadherin, N-Cadherin and Vimentin mRNA in HSC-3 under different medium conditions. (D-E) Expression levels of EMT-related protein in HSC-3 relative to internal reference protein GAPDH under different medium conditions.

2.5 受 SCs 激活的 OSCC 在体内获得了更强的增殖能力

我们通过上述体外实验发现了受 SCs 刺激的 OSCC 获得了更强的增殖、迁移和侵袭能力。为了进一步研究在体内 SCs 能否起到类似的促 OSCC 的作用, 我们构建了裸鼠体内的皮下成瘤模型。我们通过分别使用 DMEM、RCM、co-RCM 来预先处理 HSC-3 细胞 36h, 再将消化后的细胞用 PBS 重悬并注入小鼠腋下的皮下部位, 在 4 周后处死裸鼠, 记录其皮下肿瘤的体积大小并观察肿瘤的 HE 染色情况。结果发现, 相较于 DMEM 组和 RCM 组, 与 HSC-3 共培养后的施万细胞培养液能显著激活肿瘤细胞, 并在体内促进肿瘤的进展 (图 8)。

A



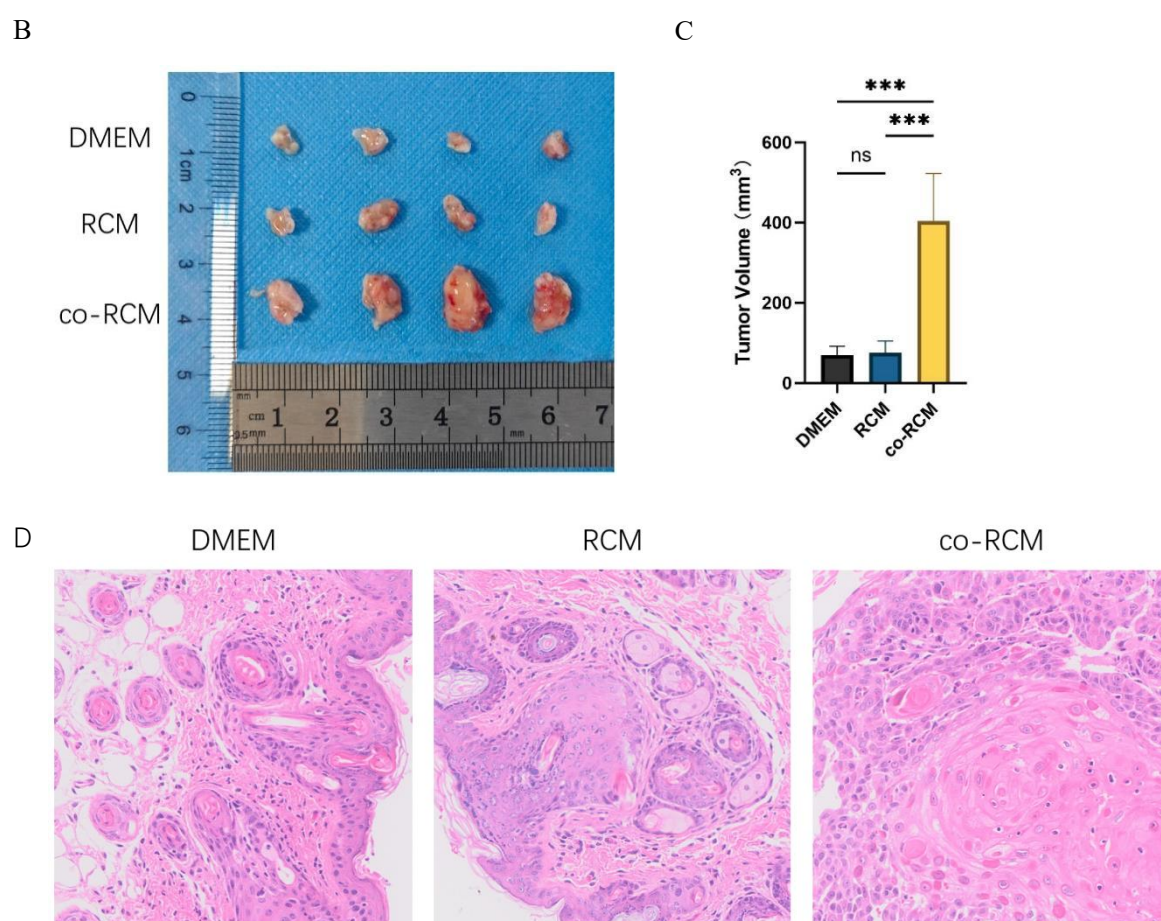


图 8 将 DMEM、RCM 和 co-RCM 分别处理 HSC-3 细胞 36h 后注入裸鼠皮下进行皮下成瘤实验。(A) 操作示意图。(B) 处死老鼠，分离解剖出皮下肿瘤并对其体积进行测量。(C) 不同组别裸鼠的皮下肿瘤情况分析，共培养后的 SCs 培养基明显促进老鼠皮下肿瘤的发生发展。(D) 裸鼠皮下肿瘤切片的 HE 染色可见癌巢和核分裂像。

Figure 8 HSC-3 cells were treated with DMEM, RCM and co-RCM respectively for 36h and then injected into the skin of nude mice for subcutaneous tumor formation experiment. (A) Schematic diagram of operation. (B) One month after the tumor cells were injected, the nude mice were killed and photographed. (C) Subcutaneous tumors were isolated and dissected and measured. (D) Analysis of subcutaneous tumors in different groups of nude mice showed that the co-cultured SCs medium significantly promoted the occurrence and development of subcutaneous tumors in mice. (E) HE staining of subcutaneous tumor sections of nude mice showed cancer nests and mitotic images.

3 讨论

近年来，SCs 在恶性肿瘤进展中的作用在胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌和宫颈癌等癌症中被相继报道，冲击了以往在神经-肿瘤研究领域单纯研究神经元细胞与肿瘤之间的关系的这种单一的思维模式，这些发现让研究焦点开始放在 SCs 这一类

神经胶质细胞在 TME 中的作用模式以及与肿瘤进展的关系^[15; 18]。OSCC 存在着广泛的 PNI, 意味着 SCs 在 OSCC 的 TME 中大量浸润并进行信号传递。我们通过一系列体内、体外实验来研究了 SCs 在 OSCC 中的作用。

我们在体外细胞实验中构建了一个非接触式的共培养系统, 这能很好的评估 SCs 与 OSCC 之间的旁分泌信号的作用, 通过单纯的施万细胞条件培养基(RCM)和与 OSCC 细胞共培养的施万细胞条件培养基(co-RCM)分别作用于 OSCC 细胞。在 CCK-8 实验的结果中, 我们发现 RCM 对 OSCC 并没有明显的促增殖作用, 而 co-RCM 能显著促进 OSCC 的体外增殖。同样的, 虽然 RCM 和 co-RCM 均能促进 OSCC 的迁移、侵袭作用, 但是 co-RCM 显示出更强的促进作用, 我们猜测 SCs 与 OSCC 交互后通过旁分泌途径获得了更强的促肿瘤能力。

EMT 是上皮细胞逐渐获得间充质细胞的结构和功能特征, 导致细胞迁移和侵袭能力上调, 促进肿瘤细胞播散。Ling Z 等人的综述充分总结了 EMT 在 OSCC 的进展中所起到重要作用^[30], 而我们的研究结果发现, SCs 能通过上调 N-Cadherin 和 Vimentin 并下调 E-Cadherin 的表达从而促进 OSCC 细胞的 EMT 过程, 说明 OSCC 在进展过程中可能受到 SCs 的正向调控, 从而促进其恶性能力。

在之前的研究中, Gloria Pascual 等人使用棕榈酸(PA)预处理的 OSCC 获得了前转移行为并携带此特征的表现遗传记忆。通过大量 RNA 测序分析表明, 具有这种前转移记忆的基因主要与刺激瘤内 SCs 和神经支配的神经特征有关。在机制上, 肿瘤相关 SCs 能够分泌一种特殊的促再生细胞外基质从而促进肿瘤转移^[31]。我们的体外动物模型实验也发现了类似的结果, 即通过与 SCs 共培养后预先激活的 OSCC 在大鼠体内表现出更强的生长能力, 我们猜测 SCs 与 OSCC 之间的相互作用使得 OSCC 获得了更具侵袭能力的表现遗传记忆。

综上所述, SCs 的条件培养基在一定程度上能够促进 OSCC 的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程。在神经损伤中, SCs 可以启动重编程程序和去分化过程, 上调或下调各类基因的表达以促进神经修复或再生过程^[32]。在 TME 中也存在着神经炎症和神经损伤, 受 OSCC 激活的 SCs 也可表现出类似的重编程程序从而加强 SCs 上述的促进 OSCC 进展的作用^[21; 33]。但 SCs 促进 OSCC 上述恶性过程的相关机制则需要进一步的研究。

第三部分 SCs 通过 CCL3/CCL4-CCR5 途径促进 OSCC 细胞迁移、侵袭和 EMT 并上调炎症水平

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

试剂名称	厂商	产地
Maraviroc	Mce	美国
大鼠 (CCL4) Elisa 试剂盒	mengbio	中国
其余试剂同第一、二部分		

1.1.2 主要仪器

仪器名称	厂商	产地
同第一、二部分		

1.2 实验方法

1.2.1 qRT-PCR

我们通过该实验分析 RSC-96 和 HSC-3 细胞中相关 mRNA 的表达水平。实验方法和步骤参考第一部分：1.2.3 qRT-PCR。我们使用字母大小写区分大鼠和人基因，其中大鼠细胞的内参基因我们选择 Gapdh。相关引物序列设计见表 3 和表 7。

表 9 引物序列
Table 9 Primer sequence

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Gapdh	CAAGAAGGTGGTGAAGCAG	CAAAGGTGGAAGAATGGG
il-6	AATCTGCTCTGGTCTTCTGG	TCTGGCTTTGTCTTTCTTGTT
il-1b	GGCACATTCTGGTCAAAGA	TCATCCCATACACACGGA

Ptger2	CCACGATGCTCATGCTCTT	TGTCCGATGGCGAGGTA
Ptgs2	TCATCGGTGGAGAGGTGT	GACGTGGGGAGGGTA
Ngf	GGCGTACAGGCAGAACC	GTCACACGGGCAGCTATT
il-10	AGGGTIACTTGGGTGTC	GGGTCTTCAGCTTCTCTCC
Ccl4	CTGCGATTCACTGCTGTC	AGGAAGTGGGAGGGTCA
Tnf-α	CAGCCAGGAGGGAGAAC	GTATGAGAGGGACGGAACC
Nrg1	CCTGGTGAACATAGCGAAT	TGACTGGTGGAAAAGGAAG
CCR5	TCTTCCTCCACCACTATGC	TGAACAACAGGCCCAGA
Ccl3	TGCCCTTGCTGTTCTTCT	AGGCTGCTGGTCTCAAAA
Ccl5	GAACCGCCAAGTGTGTG	GGAATGAGTGGGAGTAGGG

1.2.2 CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 迁移侵袭实验和蛋白质印迹（WB）

实验方法和步骤均与第一二部分内容相似。同时，通过在共培养基中是否添加 CCR5 抑制剂 Maraviroc，我们将进一步通过这些实验研究 OSCC 的 CCR5 受体与肿瘤进展之间的关系。

1.2.3 酶联免疫吸附试验（ELISA）

使用大鼠趋化因子 CCL4 一步夹心法试剂盒检测不同条件下 RSC-96 上清液的 CCL4 蛋白分泌含量。具体步骤如下：

①当 RSC-96 汇合度达到 70%时会后分别使用 DMEM、HCM、co-HCM 预处理 36h，之后将培养液均换成 DMEM 继续培养 36h。收集各组别 RSC-96 的上清液，在 4℃，2000g 的条件下离心 10 分钟去除颗粒物和聚合物，将所取得的样品收集到 EP 管中置于冰上备用。

②从 4℃冰箱中取出所需板条室温平衡 20min，设置样品孔和标准品孔，标准品孔中加入不同浓度的标准品 50ul。

③样本孔加入不同组别的待测样品 10ul，再加入样品稀释液 40ul，空白孔不加。

④标准品孔和样品孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100ul，反应孔使用封板膜封闭，在 37℃恒温孵育箱中孵育 1h。

⑤弃去废液，加满洗涤液后静置 1min，去除洗涤液并用吸水纸拍干，重复 5 次。

⑥每孔各加入 50ul 的 A、B 液，避光孵育 15min。

⑦加入 50ul 终止液后在酶标仪中 450nm 波长处测定每个孔的 OD 值。

⑧以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标绘制标准曲线并将样品 OD 值带入方程算出对应浓度。

2 实验结果

2.1 SCs 在体外改变 OSCC 炎症水平，同时启动 NF- κ B 相关通路

我们之前的研究已经发现 PNI 相关 OSCC 的肿瘤中心炎症水平显著上调，因此，我们更好奇的是 SCs 在体外是否能促进这一进程。为了初步分析这一问题，我们采用 RT-qPCR 对 DMEM、RCM 和 co-RCM 刺激下的 HSC-3 细胞的炎症相关的 mRNA 水平进行分析。结果发现，与 RSC-96 的共培养能改变 HSC-3 炎症基因表达，特别是上调促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达，同时也上调了抑炎因子 IL-10 的表达（图 9）。研究发现 IL-1 β 和 TNF- α 活跃在 NF- κ B 相关通路中，并且对肿瘤的进展起到不可忽视的重要作用^[34, 35]。因此，我们进一步研究在 HSC-3 中 p65 和 p-p65（Ser536）的蛋白表达水平，结果发现与 SCs 共培养后，HSC-3 的 p-p65/p65 的比值上调，表明 NF- κ B 信号通路的激活。

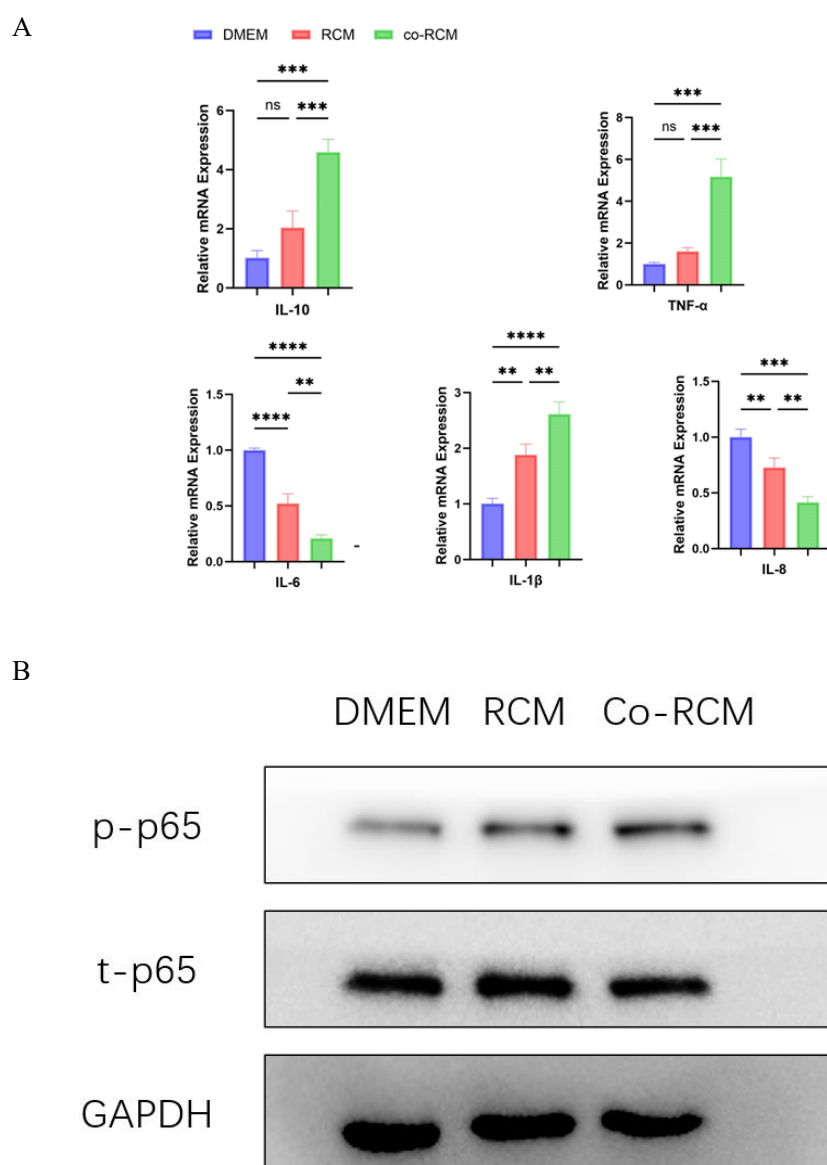


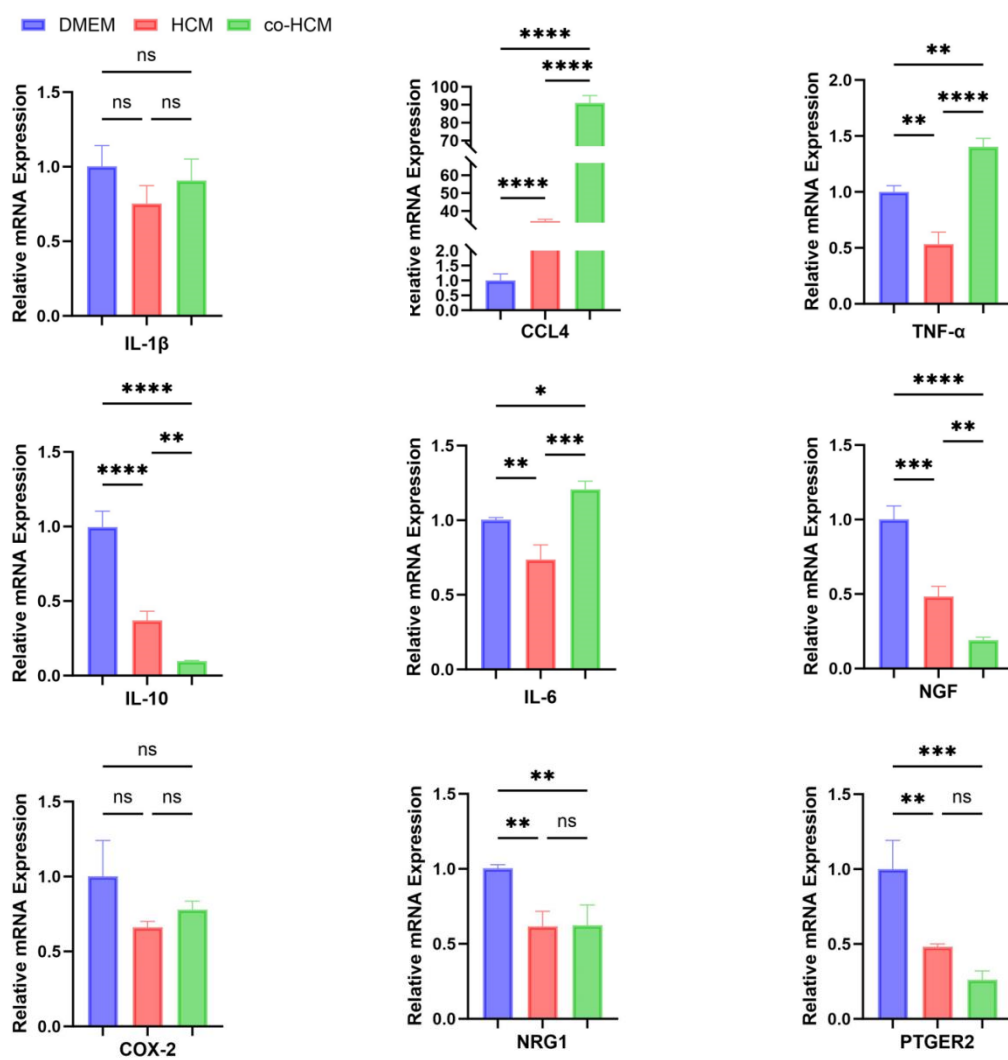
图9 SCs改变OSCC细胞内炎症相关mRNA的水平，同时启动NF- κ B相关通路。
(A) 与RSC-96共培养后HSC-3细胞内炎症相关mRNA表达改变，促炎因子IL-1 β 和TNF- α 基因表达上调。(B) RSC-96与HSC-3共培养后磷酸化p65 (Ser536) 蛋白水平上调。

Figure 9 SCs alter levels of inflammation-related mRNA in OSCC cells and activate the NF- κ B-related pathway. (A) After co-culture with RSC-96, the expression of inflammation-related mRNA in HSC-3 cells was changed, and the expression of pro-inflammatory factors IL-1 β and TNF- α genes was up-regulated. (B) The level of phosphorylated p65 (Ser536) protein was up-regulated after co-culture of RSC-96 with HSC-3.

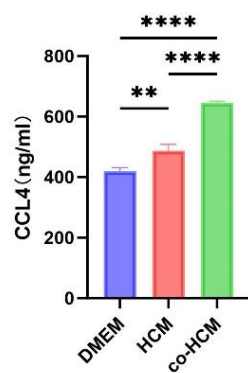
2.2 共培养促进SCs与OSCC之间的CCL3/CCL4-CCR5信号交互

为了进一步探讨 SCs 通过何种途径促进 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，我们进一步分析了受 DMEM、HCM 和 co-HCM 处理的 RSC-96 细胞内相关 mRNA 的表达。据文献报道，PNI 相关肿瘤微环境中 SCs 可以启动重编程程序促进一系列实体肿瘤的进展。而这一过程涉及了 SCs 去髓鞘化的相关基因表达，例如 NRG1。此外，SCs 也可通过另外三大途径促进肿瘤进展，即分泌白介素相关炎症因子、神经营养因子和前列腺素等。遗憾的是，我们的 RT-qPCR 结果显示，在不同组别中相关基因的表达与之前表型研究的趋势并不一致（图 10，A）。近年来逐渐开始有研究发现 SCs 能分泌趋化因子，并在肿瘤的进展中起到作用。巧合的是，我们发现 HCM 和 co-HCM 组的 HSC-3 相比于对照组高表达趋化因子 CCL4 基因，并且表达趋势和我们之前的研究一致。我们进而通过 ELISA 实验分析不同组 HSC-3 分泌的 CCL4 蛋白水平，结果发现 co-HCM 预处理组的上清液检测出了更高水平的 CCL4（图 10，B）。CCL4 的唯一受体是 CCR5，为了进一步研究 RSC-96 分泌出的 CCL4 是否会对 HSC-3 产生影响，我们通过 RT-qPCR 分析了 HSC-3 中的 CCR5 表达水平，结果发现，与 RSC96 共培养的 HSC-3 表达更高水平的 CCR5 mRNA（图 10，C）。因为 CCR5 受体同时也可以接受 CCL3 和 CCL5 信号，因此我们对 RSC-96 是否表达这些信号也产生了浓烈的兴趣。通过 qRT-PCR，我们发现 CCL3 的基因表达水平较高，其趋势与我们之前的表型研究一致，而 CCL5 基因的表达相对较低，并且不同组别的趋势与之前的研究不一致。（图 10，D）基于上述研究，我们做出假设，即 SCs 可能通过 CCL3/CCL4-CCR5 途径促进 OSCC 进展。

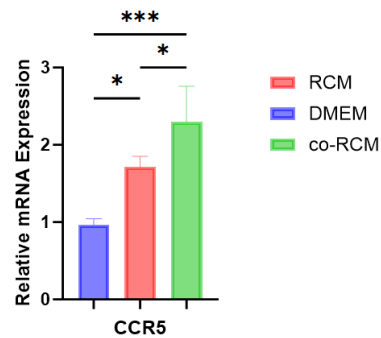
A



B



C



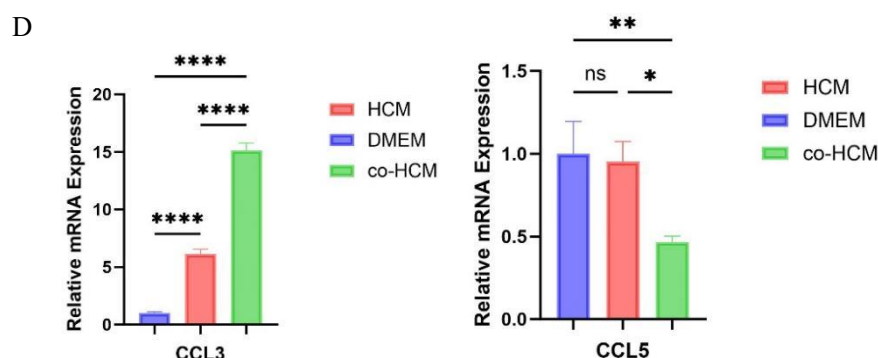


图 10 OSCC 细胞促进 SCs 分泌趋化因子 CCL3 和 CCL4。(A、D) 使用 DMEM、HCM 处理和与 HSC-3 共培养后 RSC-96 细胞内相关 mRNA 表达情况。(B) 使用不同条件培养基预处理后，ELISA 测量 RSC-96 上清液中 CCL4 的分泌情况。(C) 使用不同条件培养基预处理后，HSC-3 中 CCR5 的 mRNA 相对表达情况。

Figure 10 OSCC cells promote the secretion of chemokines CCL3 and CCL4 by SCs. (A, D) mRNA expression in RSC-96 cells after treatment with DMEM and HCM and co-culture with HSC-3. (B) The secretion of CCL4 in the supernatant of RSC-96 was measured by ELISA after pretreatment with different medium conditions. (C) Relative mRNA expression of CCR5 in HSC-3 after pretreatment with different medium conditions.

2.3 阻断 OSCC 的 CCR5 受体能部分逆转 SCs 的促肿瘤增殖作用

Maraviroc 通过改变 CCR5 受体构型可以阻断 CCL3 和 CCL4 的作用。为了研究 SCs 的促肿瘤与其分泌的 CCL3 和 CCL4 有关，我们通过在 co-RCM 中加入 Maraviroc 这一种 CCR5 受体抑制剂 (CCR5i) 来研究肿瘤增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程。根据说明书，CCR5i 的作用浓度我们最终选择了 150nm/L。

首先，我们通过 CCK-8 实验研究在 DMEM+CCR5i 组、co-RCM+CCR5i 组和 co-RCM 组中 HSC-3 细胞的增殖能力。结果发现，CCR5i 的使用可以一定程度上逆转 SCs 促肿瘤增殖的作用 (图 11)。

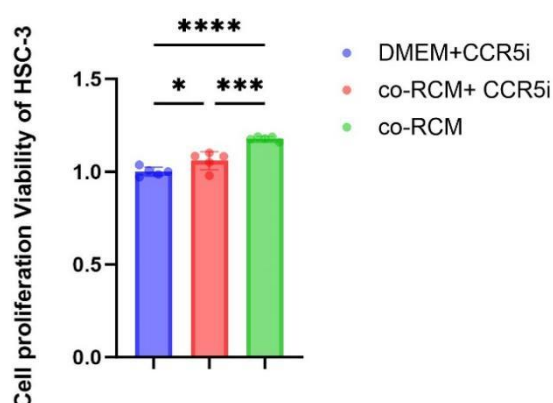


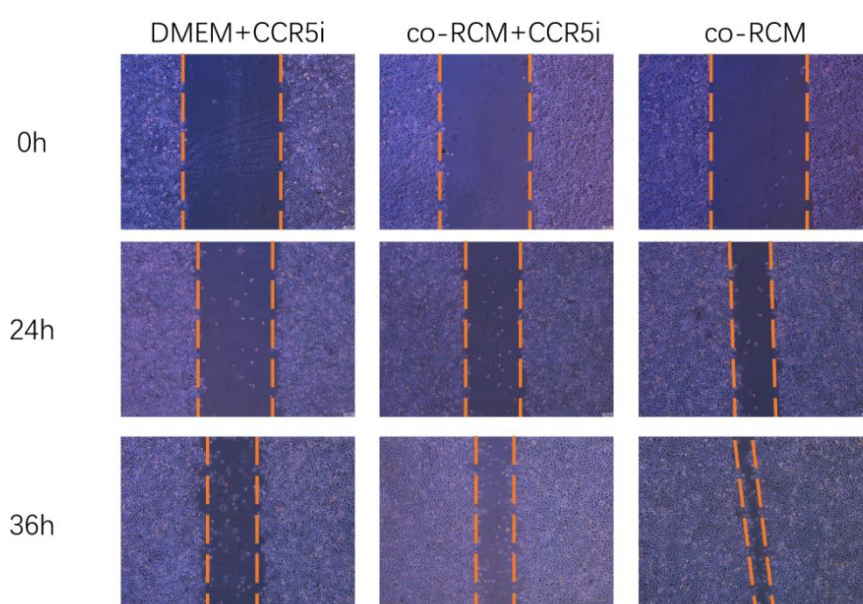
图 11 CCK-8 实验中 CCR5i 逆转 SCs 的促肿瘤增殖作用。

Figure 11 In CCK-8 assay, CCR5i reverses the effect of SCs on tumor proliferation.

2.4 阻断 OSCC 的 CCR5 受体能部分逆转 SCs 的促肿瘤迁移和侵袭能力

我们进一步研究 CCR5 受体对肿瘤迁移和侵袭能力的影响。在二维平面的划痕实验中我们发现，加入 CCR5i 后能部分抑制 RSC-96 对 HSC-3 创伤愈合的促进作用（图 12，A-B）。同样地，我们在三维平面的 Transwell 迁移和侵袭实验中发现，加入 CCR5i 后均能不同程度地逆转 RSC-96 促 HSC-3 迁移和侵袭的能力（图 12，C-D）。

A



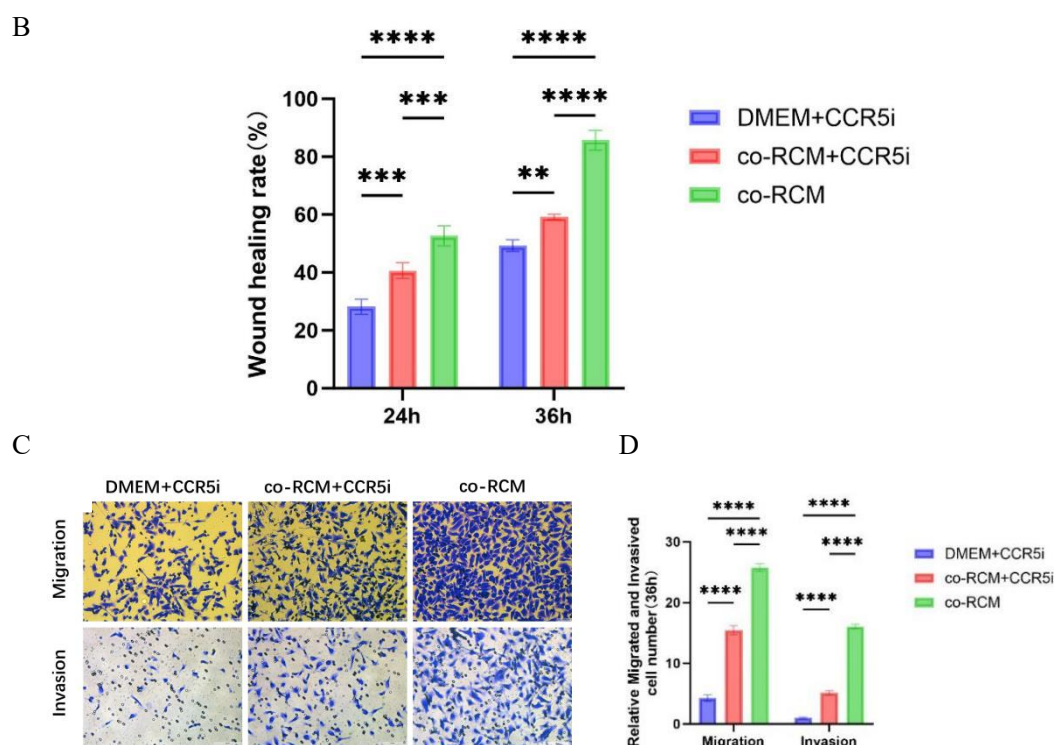


图 12 在加入含有 CCR5i 的 co-RCM 后 OSCC 的迁移、侵袭情况。(A-B) HSC-3 分别在 DMEM+CCR5i、co-RCM+CCR5i 和 co-RCM 条件下, 24h (36h) 伤口愈合率分别为 28.2% (49.3%)、40.6% (59.2%) 和 52.7% (85.7%)。(C-D) 不同处理条件下 HSC-3 在 Transwell 系统中的 36h 迁移和侵袭情况。

Figure 12 OSCC's migration and invasion after co-RCM containing CCR5i was added. (A-B) Under DMEM+CCR5i, co-RCM+CCR5i and co-RCM, the wound healing rate of 24h (36h) was 28.2% (49.3%), 40.6% (59.2%) and 52.7% (85.7%), respectively. (C-D) 36h migration and invasion of HSC-3 in Transwell system under different treatment conditions.

2.5 SCs 促肿瘤的 EMT 过程可被 CCR5i 部分逆转

我们之前的研究表明, SCs 与 OSCC 共培养的旁分泌产物可以促进肿瘤的 EMT 过程, 为了进一步探讨 CCR5 受体是否与 SCs 的这一旁分泌过程有关, 我们对不同组别的 HSC-3 细胞内的 E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白含量通过 WB 实验进行分析。结果显示, 加入 CCR5i 后可以一定程度上逆转 RSC-96 的促 EMT 过程, 包括上调 E-Cadherin, 下调 N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达(图 13)。

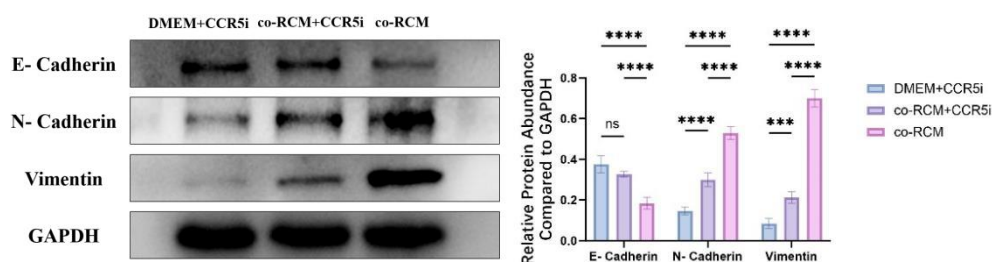


图 13 加入 CCR5i 后 co-RCM 促 OSCC 的 EMT 过程被改变。

Figure 13 The EMT process of OSCC promoted by co-RCM is changed after the addition of CCR5i.

2.6 CCR5i 抑制 SCs 的促炎作用

我们之前的研究发现 SCs 能促进 OSCC 细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 基因的高表达。为了进一步了解该过程是否与 CCR5 受体相关联，我们通过 qRT-PCR 检测加入 CCR5i 后 HSC-3 细胞内 IL-1 β 和 TNF- α 基因的表达水平。结果发现 CCR5i 不能影响 RCS-96 促肿瘤 IL-1 β 基因的表达水平，但是，却可以很大程度上抑制 RCS-96 促肿瘤 TNF- α 基因表达的作用（图 14）。

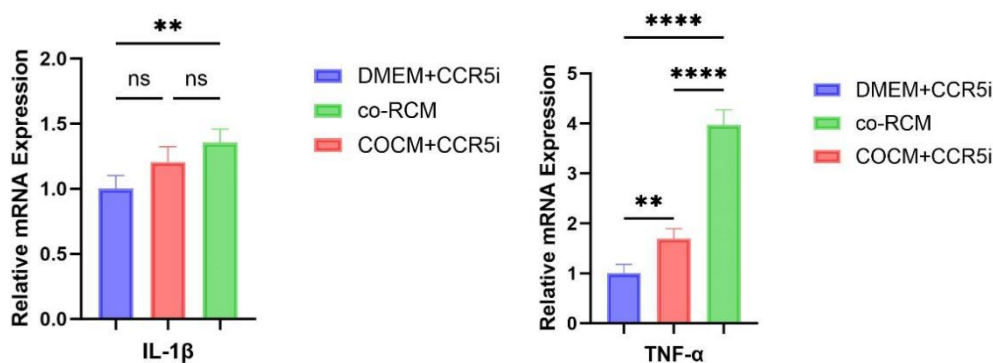


图 14 CCR5i 在 SCs 与 OSCC 信号交互间对 OSCC 炎性基因表达水平的影响。

Figure 14 The effect of CCR5i on the expression level of OSCC inflammatory gene during the interaction between SCs and OSCC signals.

3 讨论

大量的研究描述了肿瘤与免疫之间密不可分的关系。在我们第一部分的研究中发现，发生 PNI 的 OSCC 患者标本的肿瘤中心比癌旁组织存在着更活跃的 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 等促炎症因子的基因表达。而巧合的是，我们的体外细胞实验

发现与 SCs 共培养的 OSCC 也表现出更高水平的促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 。此外, 本研究还在共培养的 OSCC 细胞中检测出了更高水平的磷酸化 p65 蛋白(Ser536), 意味着在这过程中 NF- κ B 通路被上调。而 IL-1 β 、TNF- α 和磷酸化 p65 蛋白, 都与 OSCC 的进展有着积极的促进作用^[36; 37]。

趋化因子受体 5 (CCR5) 属于 G 蛋白偶联家族, 广泛表达于各类细胞类型, 这其中也包括肿瘤细胞和肿瘤相关成纤维细胞^[38]。随着相关研究的进展, CCR5 已经逐渐成为肿瘤进展和肿瘤分期的一大预测因子^[39]。CCR5 的天然配体包括 CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP-1 β) 和 CCL5 (RANTES)。TME 中的肿瘤相关巨噬细胞、T 细胞和间充质干细胞等细胞通过旁分泌 CCL5 配体作用于肿瘤细胞的 CCR5, 最终促进肿瘤生长、转移和肿瘤内血管形成^[39]。Maraviroc 作为 CCR5 抑制剂, 早期被用于艾滋病的抗病毒治疗, 近年来在肿瘤领域中的作用开始被揭露。Maraviroc 被发现在胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌中可以通过抑制肿瘤细胞对相关细胞和细胞因子的募集, 进而阻碍肿瘤的进展^[40-42], 而这一过程大多通过 CCL5/CCR5 信号轴来进行。

我们的研究结果显示 SCs 与 OSCC 细胞共培养后, 一方面可以促进 SCs 细胞内 CCL3 和 CCL4 基因的高表达, 并降低 CCL5 的 mRNA 表达水平; 另一方面能促进 OSCC 细胞内 CCR5 基因的高表达。此外, ELISA 实验也同样验证了共培养后的 SCs 表现出 CCL4 的高旁分泌水平。当采用 CCR5 抑制剂 (Maraviroc) 抑制肿瘤的 CCR5 后, 我们发现受 OSCC 激活的 SCs 所表现出的促肿瘤增殖、迁移、侵袭现象和 EMT 过程被部分抑制。而在这过程中, 我们意外地发现 OSCC 细胞内 TNF- α 的基因表达水平也被逆转。因此, 我们大胆地猜测在 TME 中, SCs 可能通过旁分泌趋化因子 CCL3/CCL4 配体作用于 OSCC 细胞上的 CCR5 受体, 促进 OSCC 的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程, 从而进一步促进肿瘤进展。而在这一过程中, TNF- α 等炎症因子也起到了重要的作用。

全文总结

口腔颌面部存在着丰富的外周神经，口腔鳞状细胞癌中有着高 PNI 发生率。作为外周神经系统中的重要成分，SCs 既能参与形成外周神经的髓鞘，也能参与形成感觉神经末梢的 Remak 束结构，还能充分参与 TME 中的各类信号串扰过程，从而影响 PNI 和肿瘤进展。研究发现 PNI 通常伴随着更差的预后，但其中具体的信号机制却尚不明确。鉴于 PNI 中肿瘤细胞能侵犯由 SCs 参与形成的神经内膜和神经末梢，并且 SCs 在多种实体肿瘤中可以通过分泌神经营养因子类信号促进肿瘤进展，我们猜测 SCs 在 OSCC 中也起着不可忽视地促肿瘤作用，而这一过程不仅与被大量研究的神经营养因子有关，还可能涉及白介素类炎症因子信号和趋化因子类信号。

我们首先通过对 30 例 PNI 相关 OSCC 患者的相关信息进行统计分析，我们最终发现 OSCC 存在着高达 53.3% 的 PNI 发生率，并且存在着显著的部位差异性。而我们的 IHC 和 IF 结果发现 OSCC 的肿瘤中心表达出更高水平的 S100B，预示着更多数量的神经元和 SCs 浸润。此外，我们还发现了 PNI 相关的 OSCC 其肿瘤中心比癌旁组织有着更高水平的炎症基因表达，例如 IL-1 β 和 TNF- α 。

然后我们构建了体外 SCs 与 OSCC 细胞之间的共培养体系来研究 SCs 在 TME 中的旁分泌作用。通过一系列细胞增殖实验、划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验我们发现 SCs 具有促 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭的作用。并且通过 qRT-PCR 和 WB 实验我们进一步发现 SCs 能促进肿瘤的 EMT 过程从而使得 OSCC 获得更强的迁移侵袭能力。我们对 OSCC 细胞内相关炎症基因的检测发现，SCs 在体外能促进 OSCC 细胞内 IL-1 β 和 TNF- α 基因的高表达，与之前我们对 OSCC 患者肿瘤中心的炎症水平研究结果比较一致。此外，我们的 WB 结果还显示 OSCC 细胞受 SCs 刺激后表达更高水平的 NF- κ B 蛋白。

最后，为了明确 SCs 通过何种途径促进了 OSCC 的增殖、迁移、侵袭和 EMT，我们通过 PCR 实验对共培养后 SCs 以及 OSCC 细胞中的相关基因进行检测，发现 SCs 表达了更高水平的 CCL3 和 CCL4 基因并通过 Elisa 实验初步验证其蛋白表达水平，而与之对应，配体 CCL3 和 CCL4 的受体 CCR5 基因在 OSCC 也存在着高表达现象。随后我们使用 CCR5 抑制剂马拉维洛克（Maraviroc）抑制 CCR5 受体

的作用,发现 SCs 的促肿瘤增殖、迁移、侵袭和 EMT 的过程被部分逆转,同时也下调了 OSCC 细胞中的 TNF- α 基因的表达。

此外,我们通过体内裸鼠的皮下成瘤模型发现,使用 OSCC 细胞激活的 SCs 的条件培养基预处理肿瘤细胞后使其成为了更具侵袭能力的表型,在裸鼠体内能明显地促进肿瘤生长。

虽然我们的研究初步说明了 SCs 促进 PNI 相关 OSCC 进展的作用机制,但仍有许多不足之处。比如,我们细胞实验的细胞选自不同种属的细胞系,其结果在人 OSCC 中的情况尚不明确。并且 OSCC 细胞作用于 SCs 并使其转变成促肿瘤表型的机制也没有做进一步研究。另外,我们的研究仅将目光放在 SCs 与肿瘤细胞之间作用,而 SCs 能否通过与 TME 其他成分进行信号交互从而间接影响肿瘤进展也需要更深入地探究。

综上所述,在 OSCC 中有着较高的 PNI 发生率,并且存在着部位差异性,PNI 能促进 OSCC 的多种恶性生物学表征,其内在机制可能是 SCs 与 TME 中口腔鳞癌细胞的相互作用并释放趋化因子 CCL3 和 CCL4,通过肿瘤细胞的 CCR5 受体而最终加速肿瘤进展。此外,CCL3 和 CCL4 作为趋化因子,在 TME 中除了直接作用于肿瘤细胞,也可以与肿瘤相关淋巴细胞、肿瘤相关巨噬细胞和肿瘤相关成纤维细胞作用,间接促进肿瘤进展,其在 TME 中的作用机制有待更深入的研究^[43]。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. 2019, 144(8): 1941-1953.
- [3] Chi A, Day T, Neville B J C a c j f c. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update [J]. 2015, 65(5): 401-421.
- [4] de Visser K, Joyce J J C c. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth [J]. 2023, 41(3): 374-403.
- [5] Bejarano L, Jordão M, Joyce J J C d. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment [J]. 2021, 11(4): 933-959.
- [6] Chen S H, Zhang B Y, Zhou B, et al. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(1): 1-21.
- [7] Lucido C T, Wynja E, Madeo M, et al. Innervation of cervical carcinoma is mediated by cancer-derived exosomes [J]. Gynecol Oncol, 2019, 154(1): 228-235.
- [8] Alkhadar H, Macluskey M, White S, et al. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Incidence, prognostic impact and molecular insight [J]. 2020, 49(10): 994-1003.
- [9] Wei P, Li W, Tai S J O--h, et al. Discrete Perineural Invasion Focus Number in Quantification for T1-T2 Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. 2019, 160(4): 635-641.
- [10] Schmitd L, Scanlon C, D'Silva N J J o d r. Perineural Invasion in Head and Neck Cancer [J]. 2018, 97(7): 742-750.
- [11] Taveggia C, Feltri M L. Beyond Wrapping: Canonical and Noncanonical Functions of Schwann Cells [J]. Annu Rev Neurosci, 2022, 45: 561-580.
- [12] Colomar A, Robitaille R. Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction [J]. Glia, 2004, 47(3): 284-289.
- [13] Whalley K. Glia: Schwann cells provide life support for axons [J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(11): 698-699.
- [14] Ma K H, Svaren J. Epigenetic Control of Schwann Cells [J]. The Neuroscientist, 2018, 24(6): 627-638.
- [15] Deborde S, Gusain L, Powers A, et al. Reprogrammed Schwann Cells Organize into Dynamic Tracks that Promote Pancreatic Cancer Invasion [J]. Cancer Discov, 2022, 12(10): 2454-2473.
- [16] Zhang Y, Sang R, Bao J, et al. Schwann cell-derived CXCL2 contributes to cancer pain by modulating macrophage infiltration in a mouse breast cancer model [J]. 2023, 109: 308-320.
- [17] Zhou Y, Shurin G V, Zhong H, et al. Schwann Cells Augment Cell Spreading and Metastasis of Lung Cancer [J]. Cancer Res, 2018, 78(20): 5927-5939.
- [18] Han S, Wang D, Huang Y, et al. A reciprocal feedback between colon cancer cells and Schwann cells promotes the proliferation and metastasis of colon cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 348.

- [19] Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1538-1554.
- [20] Gregory E, Dugan R, David G, et al. The biology and engineered modeling strategies of cancer-nerve crosstalk [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188406.
- [21] Zhang S H, Shurin G V, Khosravi H, et al. Immunomodulation by Schwann cells in disease [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(2): 245-253.
- [22] Chung M K, Jung Y H, Lee J K, et al. CD271 Confers an Invasive and Metastatic Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Upregulation of Slug [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(3): 674-683.
- [23] Kupferman M E, Jiffar T, El-Naggar A, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(14): 2047-2059.
- [24] Chuang J-Y, Tsai C-F, Chang S-W, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncology*, 2013, 49(12): 1103-1112.
- [25] Kurtz K, Hoffman H, Zimmerman M, et al. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement [J]. 2005, 129(3): 354-359.
- [26] Perez-Pacheco C, Schmitd L, Furgal A, et al. Increased Nerve Density Adversely Affects Outcome in Oral Cancer [J]. 2023, 29(13): 2501-2512.
- [27] Li X, Wang Y, Zhai Z, et al. Predicting response to immunotherapy in gastric cancer via assessing perineural invasion-mediated inflammation in tumor microenvironment [J]. 2023, 42(1): 206.
- [28] Wang J, Chen Y, Li X, et al. Perineural Invasion and Associated Pain Transmission in Pancreatic Cancer [J]. 2021, 13(18).
- [29] Su D, Guo X, Huang L, et al. Tumor-neuroglia interaction promotes pancreatic cancer metastasis [J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 5029-5047.
- [30] Ling Z, Cheng B, Tao X J I j o c. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: Challenges and opportunities [J]. 2021, 148(7): 1548-1561.
- [31] Pascual G, Domínguez D, Elosúa-Bayes M, et al. Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory via Schwann cells [J]. *Nature*, 2021, 599(7885): 485-490.
- [32] Jessen K R, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves [J]. *Glia*, 2019, 67(3): 421-437.
- [33] Shurin G V, Kruglov O, Ding F, et al. Melanoma-Induced Reprogramming of Schwann Cell Signaling Aids Tumor Growth [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(10): 2736-2747.
- [34] Zhou Q, Wu X, Wang X, et al. The reciprocal interaction between tumor cells and activated fibroblasts mediated by TNF- α /IL-33/ST2L signaling promotes gastric cancer metastasis [J]. 2020, 39(7): 1414-1428.
- [35] Callejas B, Mendoza-Rodríguez M, Villamar-Cruz O, et al. Helminth-derived molecules inhibit colitis-associated colon cancer development through NF- κ B and STAT3 regulation [J]. 2019, 145(11): 3126-3139.
- [36] Zhang Y, Yuan Y, Wu H, et al. Effect of verbascoside on apoptosis and metastasis in human oral squamous cell carcinoma [J]. 2018, 143(4): 980-991.

- [37] Lee C, Chang J, Syu S, et al. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer [J]. 2015, 230(4): 875-884.
- [38] Jiao X, Nawab O, Patel T, et al. Recent Advances Targeting CCR5 for Cancer and Its Role in Immuno-Oncology [J]. 2019, 79(19): 4801-4807.
- [39] Aldinucci D, Borghese C, Casagrande N J C. The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression [J]. 2020, 12(7).
- [40] Singh S, Mishra M, Eltoum I, et al. CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells [J]. 2018, 8(1): 1323.
- [41] Zhang F, Arnatt C, Haney K, et al. Structure activity relationship studies of natural product chemokine receptor CCR5 antagonist anibamine toward the development of novel anti prostate cancer agents [J]. 2012, 55: 395-408.
- [42] Zhang Y, Arnatt C, Zhang F, et al. The potential role of anibamine, a natural product CCR5 antagonist, and its analogues as leads toward development of anti-ovarian cancer agents [J]. 2012, 22(15): 5093-5097.
- [43] Mukaida N, Sasaki S, Baba T J A i e m, et al. CCL4 Signaling in the Tumor Microenvironment [J]. 2020, 1231: 23-32.

综述

施万细胞促进头颈癌增殖、侵袭机制的研究进展

【摘要】头颈癌存在着广泛的神经周围浸润（PNI）和肿瘤神经支配，在促进肿瘤进展的同时带来更差的预后。施万细胞（SCs）是一种神经胶质细胞，广泛分布于外周神经系统（PNS），参与神经损伤修复。近年来，越来越多的研究表明 SCs 在肿瘤微环境（TME）中扮演着重要角色。重编程 SCs 通过与肿瘤和神经进行信号交互，一方面促进 PNI 和肿瘤神经支配，另一方面直接作用于 TME 成分并促进肿瘤进展。在这篇综述中，我们主要讨论了 SCs 与癌症-神经的信号串扰模式，以及 SCs 相关信号在 TME 中的作用机制，并探讨了 SCs 相关头颈癌治疗干预的潜在靶点。

【关键词】施万细胞；头颈癌；神经周围浸润；肿瘤神经支配；肿瘤微环境

RESEARCH PROGRESS ON THE MECHANISM OF SCHWANN CELLS PROMOTING PROLIFERATION AND INVASION OF HEAD AND NECK CANCER

【Abstract】 Extensive perineural invasion (PNI) and tumor innervation are prevalent in head and neck cancer, promoting tumor progression and leading to worse prognosis. Schwann cells (SCs) are a type of glial cell widely distributed in the peripheral nervous system (PNS) and involved in nerve injury repair. Recent studies have increasingly shown that SCs play an important role in the tumor microenvironment (TME). On one hand, reprogrammed SCs promote PNI and tumor innervation through signal interactions with tumor cells and nerves. On the other hand, SCs directly act on TME components and promote tumor progression. In this review, we mainly discuss the cross-talk patterns of SCs and cancer-nerve signaling, as well as the mechanisms of action

of SC-related signals in the TME. We also explore potential therapeutic targets for SC-related head and neck cancer.

Keywords: schwann cell; head and neck cancer; perineural infiltration; tumor innervation; tumor microenvironment

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 由肿瘤细胞以及周围组织、细胞、各种信号分子和细胞外基质 (ECM) 构成^[1]。在恶性肿瘤中, TME 内各组分相互作用, 对肿瘤细胞的增殖、侵袭发挥着重要的促进作用^[1; 2]。外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 作为 TME 的重要组成部分, 近年来的研究中被发现与恶性肿瘤之间存在着密集的信号串扰^[3; 4]; 但绝大多数的研究都集中在神经元本身与肿瘤之间的信号串扰而忽略了施万细胞 (Schwann cells, SCs) 等神经胶质细胞这一成分在肿瘤微环境中的作用^[5]。SCs 是外周神经的主要成分, 几乎分布于全身各个解剖部位, 有着促进受损神经修复和再生的重要作用^[6]。近年来 SCs 被确定为促进肿瘤进展的细胞, 在胰腺癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、头颈癌等多种实体瘤中能促进肿瘤增殖、侵袭并引起或加重癌症疼痛, 尤其在胰腺癌进展中的作用与机制受到广泛的研究^[7-11]。头颈部具有丰富的 PNS, 随着相关研究的深入, SCs 在头颈癌微环境中的作用也被相继报道, 本文将以 SCs 与头颈癌为主题, 着重介绍 SCs 在头颈癌中的作用, 并探讨 SCs 与头颈癌之间的信号串扰机制, 旨在为头颈癌的进展和治疗提供新的理解与启示。

1 外周 SCs 与癌症-神经串扰

SCs 具有多种生理功能。这些功能包括促进神经电生理信号的传递、促进神经修复和神经发育、对神经元提供营养支持、产生细胞外基质、调节神经肌肉突触活动以及抗原^[12]; 除此之外, 还在癌症与神经串扰中扮演着重要角色^[6]。

1.1 PNS 与 SCs 的联系

周围神经鞘从内到外由三层结缔组织组成, 即神经内膜、神经束膜和神经外膜, SCs 作为 PNS 的主要支持细胞, 参与构成 90% 的神经内膜空间

^[13]。在外周神经形成初期，起源于神经嵴的施万细胞前体产生未成熟的 SCs，并包裹延伸的轴突，在这一过程中，SCs 通过与轴突及细胞外基质的相互作用完成对大直径 ($>1\mu\text{m}$) 神经轴突的髓鞘化 (myelination)。然而，对于无髓鞘的感觉神经而言，往往是许多轴突同时被 SCs 细胞膜包裹着，但不形成髓鞘，而是形成称为 Remak 束的结构^[14]。由于这种密切的相互关联，SCs 在外周神经的发育和损伤修复中具有重要作用，因此谈及 PNS 的时候，理所当然的不能避开 SCs。

1.2 癌症-神经串扰

癌症-神经串扰分为肿瘤神经周围浸润 (perineural invasion (PNI)) 和肿瘤神经支配 (tumor innervation)^[15-18]。许多学者对于 PNI 有着不同理解，Liebig C 等认为 PNI 是指肿瘤靠近神经，并累及至少 33% 的周长或 3 层神经鞘内任何一层^[19]。而近年来 Emory Gregory 等人认为当癌细胞沿着神经束膜侵入并迁移到神经内膜就会发生 PNI^[20]。针对这一观点，我们认为 SCs 以其形成髓鞘或不形成髓鞘但仍包裹着神经轴突的独特功能和空间位置正好与 PNI 中癌症细胞建立了联系。PNI 常见于高度神经支配的癌症中，例如几乎高达 100% 的胰腺癌、80% 的头颈癌、75% 的前列腺癌、33% 的结直肠癌以及肝癌等^[21]。一方面，PNI 患者在临床上更容易表现出剧烈疼痛或是麻木等症状；另一方面，PNI 是临床预后不良的标志，常表现为更高的复发率和更低的生存率。而肿瘤神经支配是指肿瘤可以将周围神经募集到 TME，从而通过一系列分子信号途径促进肿瘤进展。癌症可以向不同类型的神经 (例如交感神经和副交感神经) 发出信号^[20; 22; 23]。既往研究也发现不同器官的肿瘤，在其发展过程中可能会与某种特定类型的神经发生作用。通过体内实验进行交感神经或副交感神经去神经支配后也会表现出不同的促肿瘤或抑肿瘤效果。例如在头颈癌小鼠模型中，通过切除双侧颈上神经节对舌头进行交感神经切除术，最终抑制肿瘤生长和侵袭；而在胰腺癌中进行副交感神经切断后却显示出促肿瘤的作用^[5]。

虽然 PNI 与肿瘤神经支配在肿瘤和神经间表现出的运动模式不同，但其在肿瘤细胞与神经之间的相互作用结果却很相似^[23]。虽然近年来神经-肿瘤信号串扰的相关研究不断增加，但因为缺乏临床前体外模型用于以

生理相关方式对 PNI 和肿瘤神经支配进行机制研究等原因，各类肿瘤的 PNI 和肿瘤神经支配机制依旧没有完全揭开。尽管如此，足量的文献表明 SCs 可以与肿瘤细胞通过炎症因子、神经营养因子、趋化因子和神经递质等细胞产物相互作用，最终影响肿瘤进程。有趣的是，在头颈癌中可以同时表现出 PNI 与肿瘤神经支配的作用^[24]。

2 SCs 在头颈癌 TME 中的作用

2.1 SCs 重编程促进头颈癌进展

经过一个多世纪的研究讨论，Harold F Dvorak 等人认为，癌症表现为无法愈合的伤口，这一概念逐渐被大众所认可^[25]。而癌症中描述的神经损伤是肿瘤引起的损伤的一部分。在癌症中的神经损伤修复期间会启动一系列的细胞重塑过程，这其中便包括 SCs 的重编程。而在最新的研究中发现，TME 中 SCs 的重编程过程在一定程度上能加速多种癌症进展^[9]。Dyachuk V 等人发现，前体施万细胞（SCP）可以分化为多样化的细胞类型，包括未成熟的 SC，这意味着 SCs 有着巨大的可塑性潜力^[26]。事实上，SC 以其自我重新编程和重新编程周围环境的能力而著称^[27; 28]。在周围神经损伤后，有髓鞘 SCs 去分化为无髓鞘表型的“修复 SCs”，并且来自 Remak 束的 SCs 也会转化为修复 SCs，修复 SCs 通过基质重塑和释放促炎介质改变局部信号环境，招募巨噬细胞协同消除髓鞘碎片，指导轴突发生，从而帮助神经再生^[28]。而在此过程中，转录组学显示 SCs 中编码髓磷脂的转录因子 Egr2 (Krox20)、髓磷脂零蛋白 (P0)、髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 和膜相关糖蛋白 (MAG) 等结构蛋白的基因下调；同时，形成髓鞘时被下调表达的基因在修复 SCs 中被重新表达，例如胶质纤维酸蛋白 (GFAP)、p75 神经营养蛋白受体 (p75NTR)、NCAM、L1-CAM 和 NRG1 基因^[14]。有趣的是，上述重新表达的基因恰好都与 PNI 有关。在某种程度上可以认为神经损伤修复中的 SCs 重编程与 TME 中的 SCs 重编程类似^[29; 30]。巧合的是，在甲状腺癌、唾液腺癌中发现高表达的 GFAP 的 SCs，GFAP+ SCs 与癌细胞紧密结合并刺激癌细胞迁移和侵袭^[31]。Ein L、Shan C 等人通过体外间接共培养实验发现，SCs 可以增强头颈鳞癌细胞以及唾液腺腺样囊性癌细

细胞的增殖与迁移能力^[32: 33]。这些研究都说明 SCs 在 TME 以一种与神经损伤修复重编程类似的途径促进头颈癌的进展。

2.2 SCs 通过产生多种 ECM 成份促进头颈癌进展

癌细胞迁移和侵袭部分取决于 TME 中的基质。癌细胞本身与 TME 中包括 SCs 在内的其他细胞成分均可促进 ECM 修饰。与参与神经损伤修复的 SCs 类似, 在肿瘤微环境中的 SCs 能够产生一系列基质金属蛋白酶 (MMPs) 来降解 TME 中的基质, 从而达到促进肿瘤侵袭的效果, 并增强肿瘤 PNI^[11: 15]。例如, 在胰腺癌中过度表达 MMP2; 在宫颈癌中高表达 MMP2、MMP9 和 MMP12^[34: 35]; 在黑色素瘤中高表达 MMP1 等^[36]。然而, 在头颈癌微环境中的 SCs 是否能产生 MMPs 对 ECM 进行修饰还尚未有相关研究。但 Gloria Pascual 等人使用棕榈酸 (PA) 预处理的口腔癌细胞获得了前转移行为并携带此特征的表现遗传记忆。通过大量 RNA 测序分析表明, 具有这种前转移记忆的基因主要与刺激瘤内 SCs 和神经支配的神经特征有关。在机制上, 肿瘤相关 SCs 分泌一种特殊的促再生细胞外基质, 其消融可抑制转移的发生^[37]。总的来说, ECM 组成成分相对复杂, 在头颈癌中 ECM 受到施万细胞调控从而影响肿瘤进程的机制研究还相对较少, 在此方面还有相当广阔的研究前景。

2.3 SCs 通过多种信号分子重塑 TME 并促进头颈癌进展

SCs 本身是一类神经胶质细胞, 但在神经修复环境中却可表现出免疫功能, 包括识别抗原、呈递抗原和传递免疫反应^[38]。因此处于不同阶段的 SCs 还可以分泌不同类型的信号分子, 例如神经营养因子和神经相关蛋白、趋化因子、炎症因子等。在复杂的 TME 中通过上述分子信号, SCs 一方面可以通过直接物理接触和旁分泌作用影响肿瘤细胞, 促进癌症的上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、增殖、运动和转移^[11]。另一方面, SCs 通过与 TME 中的其他细胞相互作用来抑制 TME 中的免疫微环境从而促进癌症进展与癌痛发生发展^[29: 30: 39]。在各类恶性肿瘤微环境的研究中发现, SCs 相关信号分子和其受体存在着高表达的现象并可以通过不同途径促进肿瘤进展, 虽然其中部分信号分子还未被证实由 SCs 分泌, 但却为今后的研究提供了一条新思路。

2.3.1 神经营养因子（neurotrophin, NT）和神经相关蛋白

SCs 作为神经胶质细胞，既能分泌 NT，也能分泌促进神经生长与存活的相关蛋白，包括神经营养因子（Nerve growth factor , NGF）、脑源性神经营养因子（Brain-derived neurotrophic factor ,BDNF）、胶质细胞源性神经营养因子（Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor, GDNF）和神经细胞粘附分子 1（NCAM1）等信号分子。已有足量研究发现在不同类型的 TME 中 SCs 可以分泌 NT 并促进癌症进展。在头颈癌的研究中，相关 NT 和神经营养蛋白也逐渐出现在大众视野。

2.3.1.1 神经生长因子（NGF）

NGF 是神经营养因子家族的成员，可激活两种类型的膜受体：（1）原肌球蛋白受体激酶 A (TrkA) 酪氨酸激酶 （2）p75 神经营养因子受体（p75NTR/CD271），该受体属于肿瘤坏死因子（TNF）受体家族，是一种低亲和力神经生长因子受体，并且可以和各类神经营养因子结合^[40]。Lin C 等人发现颈部鳞状细胞癌（HNSCC）中 NGF 和 TrkA 蛋白表达水平比匹配的邻近正常组织更高，经体外和体内模型验证了旁分泌的 NGF/TrkA 轴通过激活 STAT3 促进 HNSCC 的 EMT 过程，并赋予了 HNSCC 对于 EGFR 靶向治疗耐药性的新证据^[41]。此外，在对 HNSCC 标本进行分析时，作者发现 PNI 阳性和 PNI 阴性肿瘤标本之间的 TrkA 基因表达没有差异，但 NGF 基因的表达在 PNI 阳性肿瘤中升高。对此进行进一步分析后作者发现 NGF 的高表达与更大的肿瘤大小、更高的病理分级和 PNI 显著相关。Chung MK 等人发现，口腔癌细胞中高表达 CD271，通过 NGF 激活 CD271 可导致肿瘤细胞 Slug 上调并促进 EMT 过程，最终导致更强的侵袭性和淋巴转移能力^[42]。

2.3.1.2 脑源性神经营养因子（BDNF）

BDNF 也属于神经营养因子家族成员，通常与其高亲和力受体原肌球蛋白受体激酶 B（TrkB）结合。BDNF/TrkB 信号通路在胰腺癌等多种癌症中被证明能促进癌细胞增殖、侵袭和瘤内新血管的形成^[43: 44]。研究发现在 HNSCC 中 BDNF 和 TrkB 高表达，通过 BDNF/TrkB 信号能加强肿瘤细胞

的侵袭能力^[45]。此外, BDNF/TrkB 信号也能促进口腔鳞状细胞癌(OSCC)的 PNI 进展。Kupferman 等人通过对 HNSCC 标本的转录学分析和免疫组化分析发现 BDNF 和 TrkB 表达明显上调。作者进一步使用 HNSCC (其中包括 OSCC) 肿瘤细胞进行体外细胞实验, 结果发现肿瘤高表达 TrkB, BDNF 处理后肿瘤细胞获得了更强的迁移和侵袭能力。通过一系列体内体外实验, 作者证实肿瘤细胞通过 BDNF/TrkB 轴上调胞内 AKT 信号并进一步引起 EMT, 最终导致癌症进展^[46]。Ein 等人通过在二维平面中共培养人 Schwann 细胞和人舌 SCC(SCC9) 进行迁移和侵袭测定, 并进行延时成像。结果发现癌细胞优先向施万细胞迁移, 两种细胞类型在接触后发生显着的嵌入和混合。在共培养中, BDNF 的加入虽然不影响 SCs 或癌细胞的迁移, 但增强了细胞类型的嵌入并增加了癌细胞分散。相反, 用 ANA-12 抑制 TrkB 会引发 SCs 去分化和激活(上调 GFAP), 并增加雪旺细胞向癌症的迁移。TrkB 的抑制还减少了施万细胞和癌细胞的嵌入, 从而导致细胞类型之间形成明确的边界^[32]。尽管 TrkB 抑制与 SCs 去分化和预防癌细胞分散之间的关联尚不完全清楚, 但这些发现表现出一种可能对 PNI 具有抑制作用的现象, 需要进一步研究。

2.3.1.3 胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)

胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)也是广受研究的一类神经营养因子, 可以通过与其受体 GDNF 家族受体- α 1(GFR α 1) 结合并激活其同源 RET 受体酪氨酸激酶。Chuang 等人发现在 OSCC 组织中 GDNF 的表达高于正常组织, 通过一系列受体抑制剂、中和抗体和 siRNA 转染研究证明, GDNF 通过激活 GFR α 1 受体和调控 MMP-9 和 MMP-13 的分泌促进癌细胞迁移^[47]。Lin 等人通过癌症基因组图谱数据库中大量 HNSCC 的 RNA 测序数据发现, 涉及 PNI 的肿瘤比没有 PNI 的肿瘤表达更多的 GDNF mRNA^[48]。Lin 还通过在 Matrigel 中将背根神经节与 HNSCC (HN4) 细胞进行共培养, 结果发现加入 GDNF 后癌细胞朝神经突迁移。RET 抑制剂治疗可减少癌症沿神经突的侵袭, 表明 GDNF 可能在 HNSCC 中通过 GDNF/RET 轴促进肿瘤 PNI^[48]。

2.3.1.4 神经细胞粘附分子 1(NCAM1)

NCAM1 是一种糖蛋白,能介导细胞与细胞及细胞与 ECM 间的相互作用,通过与成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1) 结合,诱导神经突生长和神经元迁移。在前列腺癌、胰腺癌和皮肤鳞状细胞癌中均可发现通过 SCs 产生的高水平 NCAM1,并促进 PNI^[11: 49: 50]。Vural 等人对 66 例 HNSCC 进行了 NCAM 的免疫组织化学分析,发现 PNI 样本中有 93%存在着 NCAM 表达,而无 PNI 的标本中只有 9 例(36%)表达 NCAM。两组 NCAM 表达差异有统计学意义($P < 0.01$)^[51]。McLaughlin 等人通过 76 例 HNSCC 标本得出的结果与之相同^[52]。但 Solares 等人发现在头颈部皮肤鳞状细胞癌中 NCAM 的表达水平不能预测肿瘤是否发生 PNI^[53]。

2.3.2 其他细胞因子

随着对 SCs 研究的深入,现已证实 SCs 能产生白细胞介素(如 IL-1、IL-6、IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和趋化因子(如 CCL2、CCL3、CCL5、CCL12)等细胞因子,这些细胞因子通过与 TME 中各类细胞成分之间的信号串扰进而促进不同类型癌症的进展。Zhang B 等人通过体外实验发现,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)通过 bFGF/PI3K/Akt/c-myc/GFAP 途径激活 SCs,活化的 SCs 分泌 IL-33 招募巨噬细胞进入神经周围环境,促进巨噬细胞的 M2 促肿瘤极化^[54]。Tian Z 等通过体内和体外实验发现 TIMP1 和趋化因子 CCL7 在胰腺导管腺癌(PDAC)细胞和 SCs 之间形成旁分泌反馈回路。PDAC 细胞来源的 TIMP1 通过 CD63/PI3K/AKT 信号传导促进 SCs 增殖和迁移;而活化 SCs 分泌的 CCL7 通过 CCR2/STAT3 增强 PDAC 细胞的迁移、侵袭和 TIMP1 的表达并促进 PNI 过程^[55]。

可惜的是,虽然在头颈癌中发现上述细胞因子对于癌症的促进作用,但却少有报道此类细胞因子来源于 TME 中的 SCs,仅有 Salvo E 等人在口腔癌中发现癌细胞激活的 SCs 可以通过分泌 TNF- α 和 NGF 来促进癌症进展和癌痛^[56]。因此,在头颈癌中 SCs 释放的细胞因子信号能否以在其他类癌别症中类似的作用来促进癌症进展有待更深入的研究。

3 头颈癌潜在的治疗干预措施

针对 SCs 在头颈癌中被阐述的分子与细胞机制以及神经与肿瘤信号串扰机制（图 1），我们考虑是否可以通过化学药物治疗、放射治疗和新型靶向疗法阻断施万细胞介导的旁分泌途径和神经-肿瘤信号过程。一方面，针对 NT 和神经营养蛋白及其受体的抑制剂可以通过阻止 SCs 与癌细胞的信号过程从而抑制头颈癌的进展和 PNI。另一方面，在与胰腺癌细胞共培养模型中，背根神经节暴露于 4Gy 的单次辐射可显著降低 GDNF 表达并抑制 PNI；小鼠坐骨神经暴露于 8Gy 的辐射可减少植入胰腺癌细胞的小鼠的 GDNF 表达，降低 PNI 的同时保留神经功能^[57]。因此，阐明放射治疗如何潜在地改变头颈癌的神神经微环境以降低 PNI 的发生率也是今后转换研究的一大方向。此外，随着 SCs 与神经和 TME 中各类细胞信号串扰机制的深入研究，针对头颈癌的免疫疗法有着巨大的潜力，可能会彻底改变伴有 PNI 和肿瘤神经支配一类的头颈癌的治疗。

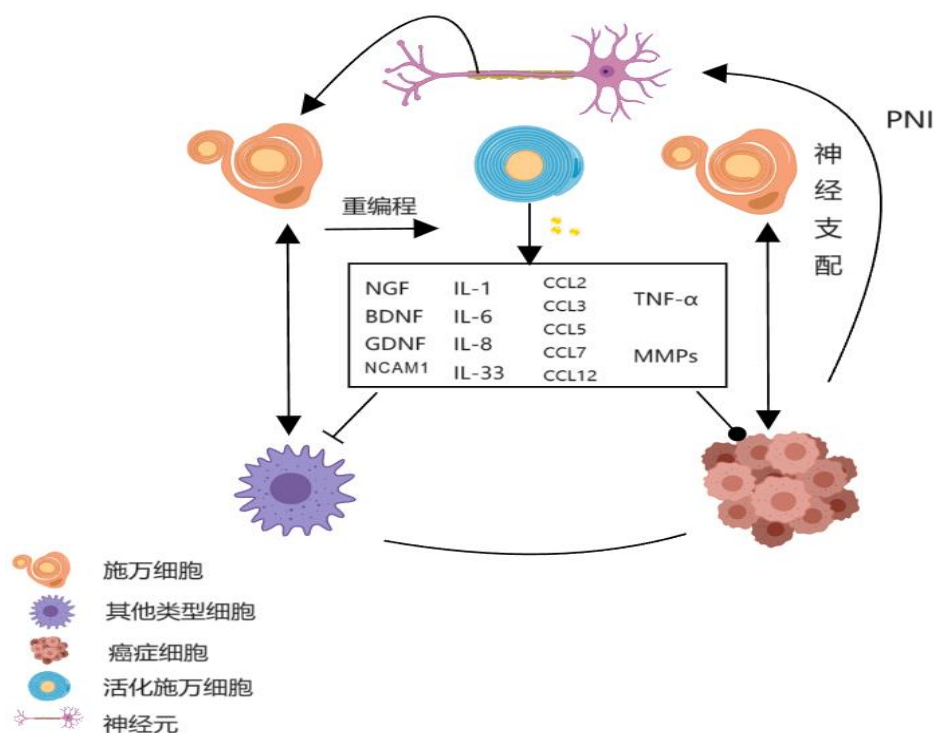


图 1 SCs 在 TME 中的作用模式

4 结语

SCs 与 TME 中各组分之间的信号串扰和其导致的神经-肿瘤信号激活是头颈癌的一个不良预后因素，会增加头颈癌患者的局部区域复发率并降低疾病特异性生存率和无复发生存率。深入阐述此过程的分子和细胞机制以及放疗、化疗、免疫疗法和靶向治疗等调节神经-肿瘤通信的过程对于改进和发掘新的头颈癌的治疗方案至关重要。

参考文献

- [1] de Visser K, Joyce J J C. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth [J]. 2023, 41(3): 374-403.
- [2] Bejarano L, Jordão M, Joyce J J C d. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment [J]. 2021, 11(4): 933-959.
- [3] Hutchings C, Phillips J A, Djamgoz M B A. Nerve input to tumours: Pathophysiological consequences of a dynamic relationship [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(2): 188411.
- [4] Silverman D A, Martinez V K, Dougherty P M, et al. Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-talk [J]. Cancer Res, 2021, 81(6): 1431-1440.
- [5] Zahalka A H, Frenette P S. Nerves in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(3): 143-157.
- [6] Taveggia C, Feltri M L. Beyond Wrapping: Canonical and Noncanonical Functions of Schwann Cells [J]. Annu Rev Neurosci, 2022, 45: 561-580.
- [7] Deborde S, Gusain L, Powers A, et al. Reprogrammed Schwann Cells Organize into Dynamic Tracks that Promote Pancreatic Cancer Invasion [J]. Cancer Discov, 2022, 12(10): 2454-2473.
- [8] Zhang Y, Sang R, Bao J, et al. Schwann cell-derived CXCL2 contributes to cancer pain by modulating macrophage infiltration in a mouse breast cancer model [J]. 2023, 109: 308-320.
- [9] Zhou Y, Shurin G V, Zhong H, et al. Schwann Cells Augment Cell Spreading and Metastasis of Lung Cancer [J]. Cancer Res, 2018, 78(20): 5927-5939.
- [10] Han S, Wang D, Huang Y, et al. A reciprocal feedback between colon cancer cells and Schwann cells promotes the proliferation and metastasis of colon cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 348.
- [11] Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion [J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1538-1554.
- [12] Colomar A, Robitaille R. Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction [J]. Glia, 2004, 47(3): 284-289.
- [13] Whalley K. Glia: Schwann cells provide life support for axons [J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(11): 698-699.
- [14] Ma K H, Svaren J. Epigenetic Control of Schwann Cells [J]. The Neuroscientist, 2018, 24(6): 627-638.
- [15] Deborde S, Wong R J. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves [J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(24): 4405-4420.
- [16] Chen S H, Zhang B Y, Zhou B, et al. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(1): 1-21.
- [17] Ceyhan G O, Demir I E, Rauch U, et al. Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104(10): 2555-2565.
- [18] Lucido C T, Wynja E, Madeo M, et al. Innervation of cervical carcinoma is mediated by cancer-derived exosomes [J]. Gynecol Oncol, 2019, 154(1): 228-235.

- [19] Liebig C, Ayala G, Wilks J A, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature [J]. *Cancer*, 2009, 115(15): 3379-3391.
- [20] Gregory E, Dugan R, David G, et al. The biology and engineered modeling strategies of cancer-nerve crosstalk [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188406.
- [21] Bapat A A, Hostetter G, Von Hoff D D, et al. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 695-707.
- [22] Entschladen F, Palm D, Lang K, et al. Neoneurogenesis: tumors may initiate their own innervation by the release of neurotrophic factors in analogy to lymphangiogenesis and neoangiogenesis [J]. *Med Hypotheses*, 2006, 67(1): 33-35.
- [23] Vermeer P D. Exosomal Induction of Tumor Innervation [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(14): 3529-3535.
- [24] Bakst R L, Glastonbury C M, Parvathaneni U, et al. Perineural Invasion and Perineural Tumor Spread in Head and Neck Cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019, 103(5): 1109-1124.
- [25] Dvorak H F. Tumors: wounds that do not heal-redux [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(1): 1-11.
- [26] Dyachuk V, Furlan A, Shahidi M K, et al. Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors [J]. *Science*, 2014, 345(6192): 82-87.
- [27] Milichko V, Dyachuk V. Novel Glial Cell Functions: Extensive Potency, Stem Cell-Like Properties, and Participation in Regeneration and Transdifferentiation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 809.
- [28] Jessen K R, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves [J]. *Glia*, 2019, 67(3): 421-437.
- [29] Shurin G V, Kruglov O, Ding F, et al. Melanoma-Induced Reprogramming of Schwann Cell Signaling Aids Tumor Growth [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(10): 2736-2747.
- [30] Zhang S H, Shurin G V, Khosravi H, et al. Immunomodulation by Schwann cells in disease [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(2): 245-253.
- [31] Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(4): 1538-1554.
- [32] Ein L, Bracho O, Mei C, et al. Inhibition of tropomyosine receptor kinase B on the migration of human Schwann cell and dispersion of oral tongue squamous cell carcinoma in vitro [J]. 2019, 41(12): 4069-4075.
- [33] Shan C, Wei J, Hou R, et al. Schwann cells promote EMT and the Schwann-like differentiation of salivary adenoid cystic carcinoma cells via the BDNF/TrkB axis [J]. 2016, 35(1): 427-435.
- [34] Chen G, Zheng Z, Sun H, et al. Dedifferentiated Schwann cells promote perineural invasion mediated by the PACAP paracrine signalling in cervical cancer [J]. 2023, 27(23): 3692-3705.
- [35] Huang T, Fan Q, Wang Y, et al. Schwann Cell-Derived CCL2 Promotes the Perineural Invasion of Cervical Cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 19.
- [36] Ferdoushi A, Li X, Griffin N, et al. Schwann Cell Stimulation of Pancreatic Cancer Cells: A Proteomic Analysis [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1601.

- [37] Pascual G, Domínguez D, Elosúa-Bayes M, et al. Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory via Schwann cells [J]. *Nature*, 2021, 599(7885): 485-490.
- [38] Man L L, Liu F, Wang Y J, et al. The HMGB1 signaling pathway activates the inflammatory response in Schwann cells [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(10): 1706-1712.
- [39] Martyn G V, Shurin G V, Keskinov A A, et al. Schwann cells shape the neuro-immune environs and control cancer progression [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(11): 1819-1829.
- [40] Huang E J, Reichardt L F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 677-736.
- [41] Lin C, Ren Z, Yang X, et al. Nerve growth factor (NGF)-TrkA axis in head and neck squamous cell carcinoma triggers EMT and confers resistance to the EGFR inhibitor erlotinib [J]. *Cancer Letters*, 2020, 472: 81-96.
- [42] Chung M K, Jung Y H, Lee J K, et al. CD271 Confers an Invasive and Metastatic Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Upregulation of Slug [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(3): 674-683.
- [43] Sclabas G M, Fujioka S, Schmidt C, et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(2 Pt 1): 440-449.
- [44] Oyama Y, Nagao S, Na L, et al. TrkB/BDNF Signaling Could Be a New Therapeutic Target for Pancreatic Cancer [J]. 2021, 41(8): 4047-4052.
- [45] Dudás J, Riml A, Tuertscher R, et al. Brain-Derived Neurotrophin and TrkB in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2).
- [46] Kupferman M E, Jiffar T, El-Naggar A, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29(14): 2047-2059.
- [47] Chuang J-Y, Tsai C-F, Chang S-W, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncology*, 2013, 49(12): 1103-1112.
- [48] Lin C, Cao W, Ren Z, et al. GDNF secreted by nerves enhances PD-L1 expression via JAK2-STAT1 signaling activation in HNSCC [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(11): e1353860.
- [49] Brugière C, El Bouchtaoui M, Leboeuf C, et al. Perineural Invasion in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Is Linked to Neurotrophins, Epithelial-Mesenchymal Transition, and NCAM1 [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(9): 2063-2066.
- [50] Li R, Wheeler T, Dai H, et al. Neural cell adhesion molecule is upregulated in nerves with prostate cancer invasion [J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(5): 457-461.
- [51] Vural E, Hutcheson J, Korourian S, et al. Correlation of neural cell adhesion molecules with perineural spread of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 122(5): 717-720.
- [52] McLaughlin R B, Jr., Montone K T, Wall S J, et al. Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: a predictor of propensity toward perineural spread [J]. *Laryngoscope*, 1999, 109(5): 821-826.

[53] Solares C A, Brown I, Boyle G M, et al. Neural cell adhesion molecule expression: no correlation with perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Head Neck*, 2009, 31(6): 802-806.

[54] Zhang B, Guo X, Huang L, et al. Tumour-associated macrophages and Schwann cells promote perineural invasion via paracrine loop in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. 2024, 130(4): 542-554.

[55] Tian Z, Ou G, Su M, et al. TIMP1 derived from pancreatic cancer cells stimulates Schwann cells and promotes the occurrence of perineural invasion [J]. 2022, 546: 215863.

[56] Salvo E, Tu N, Scheff N, et al. TNF α promotes oral cancer growth, pain, and Schwann cell activation [J]. 2021, 11(1): 1840.

[57] Bakst R L, Lee N, He S, et al. Radiation impairs perineural invasion by modulating the nerve microenvironment [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39925.